

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche

Scuola di Dottorato di Ricerca in

Oncologia e Oncologia chirurgica

XXIII ciclo

**Analisi del programma tollerogenico delle cellule soppressorie di
origine mieloide**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Paola Zanovello

Supervisore: Ch.mo Prof. Vincenzo Bronte

Dottorando: Dott.ssa Francesca Papalini

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

| | |
|---|----|
| SUMMARY | 1 |
| RIASSUNTO | 2 |
| INTRODUZIONE | 3 |
| Immunosorveglianza ed “Immunoediting” | 3 |
| Cellule mieloidi soppressorie | 5 |
| Immunosoppressione | 8 |
| Arginasi ed ossido nitrico sintetasi | 10 |
| Cooperazione ARG1 e NOS2 | 12 |
| Eterogeneità fenotipica delle MDC | 16 |
| Eterogeneità funzionale delle MDSC | 17 |
| Microambiente tumorale: fattori che espandono le MDSC | 18 |
| ATP come messaggero extracellulare | 25 |
| Recettori purinergici | 25 |
| ATP extracellulare nell’immunità | 27 |
| Adenosina extracellulare nell’immunità | 30 |
| Chemio-immunoterapia | 32 |
| MATERIALI E METODI | 35 |
| SCOPO DELLA TESI | 42 |
| RISULTATI | 44 |
| Effetto del farmaco chemioterapico 5-FU sui diversi subsets di MDSC | 44 |
| Alcuni subsets mieloidi rappresentano un target preferenziale del farmaco 5-FU a causa della loro attività proliferativa | 46 |
| Il 5-FU causa una reciproca modulazione delle frazioni CD11b ⁺ /Gr-1 ^{int} e CD11b ⁻ /Gr-1 ^{int} | 48 |
| Caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule CD11b ⁺ /Gr-1 ^{int} e CD11b ⁻ /Gr-1 ^{int} | 51 |
| Saggio <i>in vitro</i> di “cobblestone area-forming cell” | 53 |
| MDSC e CD8 ⁺ T _{CM} condividono una nicchia di sviluppo comune nella milza | 55 |
| La milza, in animali con tumore, è l’organo centrale per l’induzione della tolleranza | 59 |
| Analisi delle risposte della linea cellulare MSC-1 in seguito a stimolazione con nucleotidi purinici e pirimidinici | 61 |
| La stimolazione dei recettori purinergici con ATP e BzATP induce permeabilizzazione della membrana plasmatica | 63 |
| La stimolazione delle MSC-1 con ATP o BzATP determina depolarizzazione della membrana plasmatica | 65 |
| La stimolazione con ATP e BzATP induce contrazione cellulare e formazione di Microvescicole | 66 |
| La stimolazione con ATP potenzia l’attività citotossica di BM-MDSCs | 68 |
| DISCUSSIONE | 70 |
| BIBLIOGRAFIA | 73 |

SUMMARY

Tumor can activate a complex network of negative control of the immune response, inducing immunological tolerance. Antitumor chemotherapy causes immunosuppression but also favours activation of immune effectors by either triggering immunogenic cancer cell death or removing immunosoppressive constraints established in the host by growing tumors. In this work we demonstrated that the antimetabolite 5-fluoruracil can reduce for a long time the number of myeloid derived suppressor cells (MDSCs) residing in the spleen. This chemothrapeutic drug does not affect directly cancer cells but perturb a biological niche shared by central memory CD8⁺ T cells and a population of tumor-induced, actively proliferating, immunosuppressive myeloid cells. Depletion of this niche by surgical removal completely abrogates tumor-induced tolerance.

Moreover, we began to characterize the effects of ATP on the suppressive function of MDSCs; in particularly we focused on the ATP effects mediated by P2 purinergic receptors. The preliminary data that we obtained in this study open a new prospective on a different set of metabolites that can determine the functional properties of MDSCs. This is of particular interest in cancer therapies since the extra-cellular concentration of ATP at the tumor site is abnormally elevated.

RIASSUNTO

Le cellule tumorali sono in grado di modulare la reattività del sistema immunitario mediante un insieme di processi che regolano negativamente la risposta immunitaria. Questo processo è meglio noto come tolleranza immunologica. La chemioterapia antitumorale causa immunosoppressione ma favorisce anche l'attivazione di cellule effettrici del sistema immunitario sia, promuovendo la morte immunogenica delle cellule tumorali, che riducendo una componente cellulare fondamentale nella deregolazione della risposta immune indotta dal tumore. In questo lavoro abbiamo mostrato come il farmaco antimetabolita 5-fluorouracile induca un riduzione della popolazione mieloidi soppressoria residente nella milza, attraverso una duratura azione che non influenza direttamente le cellule tumorali e che dipende integralmente dalla perturbazione della nicchia biologica condivisa dalle cellule CD8⁺ T central memory (T_{CM}) e da un popolazione di cellule mieloidi attivate dal tumore, altamente proliferanti e dotate di una potente azione immunosoppressiva. L'eliminazione di questa nicchia mediante rimozione chirurgica della milza abroga completamente la tolleranza immunitaria indotta dal tumore.

Inoltre, allo scopo di studiare i complessi meccanismi molecolari responsabili della funzione soppressoria delle MDSC, abbiamo caratterizzato la risposta purinergica P2-mediata indotta da ATP nelle cellule mieloidi, gettando le basi per una futura e approfondita indagine degli effetti mediati da questo messaggero extracellulare presente in elevate concentrazioni nel microambiente tumorale.

INTRODUZIONE

Immunosorveglianza ed “immunoediting”

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 neoantigeni 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^{-/-} (che mancano di enzimi coinvolti nel riarrangiamento dei recettori linfocitari e nella riparazione di danni al DNA espressi esclusivamente nel comparto linfoide e sono privi di cellule B, T e NK), ad esempio, hanno mostrato che tumori sviluppatisi in assenza di un sistema immunitario intatto sono più immunogenici di tumori cresciuti in ospiti immunocompetenti (Shankaran, Ikeda et al. 2001). L'ambiente immunologico, infatti, seleziona varianti tumorali che hanno maggiori possibilità di sopravvivere in un ospite immunocompetente grazie alla ridotta immunogenicità o perché hanno acquisito meccanismi di evasione o soppressione 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 la citochina IFN- γ .

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 ed IFN- γ , 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).

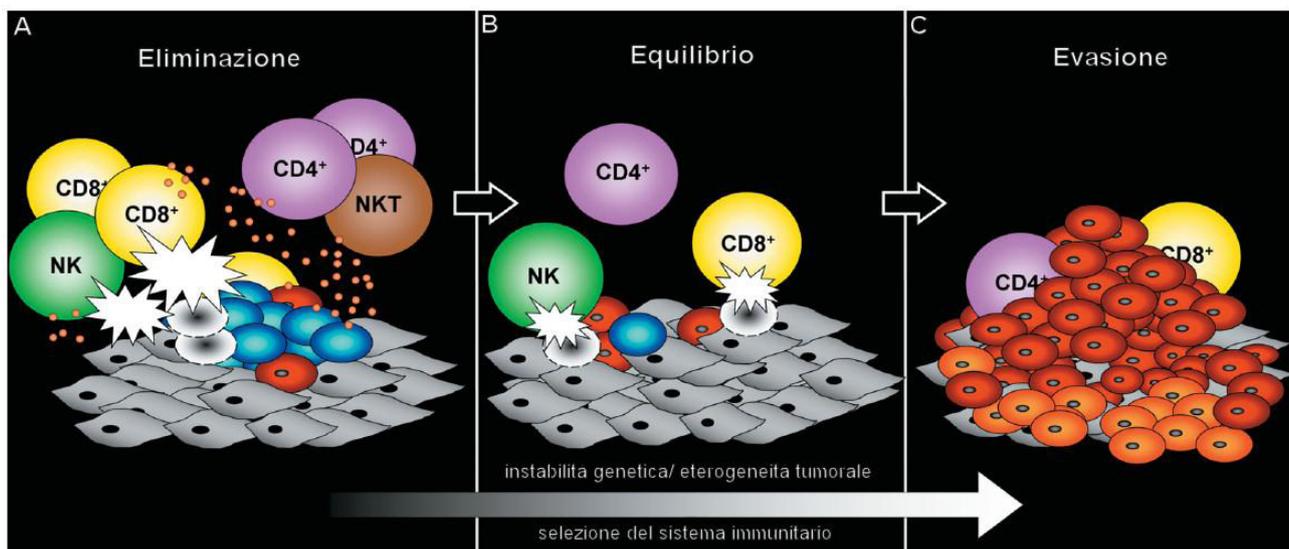


Figura 1. Le tre fasi del processo di “cancer immunoeediting.

(A) L'eliminazione corrisponde allo stadio di immunosorveglianza antitumorale. (B) L'equilibrio rappresenta la fase durante cui il sistema immunitario seleziona e promuove l'insorgenza di varianti tumorali con un'augmentata capacità di eludere la risposta immune. (C) L'escape o evasione è il momento in cui il sistema immunitario non riesce più a contenere l'espansione del tumore, che cresce in maniera incontrollata.

Nella figura sono rappresentate in grigio le cellule di tessuto sano; in blu le cellule tumorali, ed in rosso ed arancione le varianti tumorali di nuova insorgenza.

Figura tratta e modificata da Dunn et al. (2002) “Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape:”, Nature Immunology.

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- γ . 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 beneficiare

anche della sovrapproduzione da parte delle cellule trasformate di citochine inibitorie, quali TGF- β 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 indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO) (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⁺CD25⁺ (Treg), o l'induzione di cellule mieloidi soppressorie e macrofagi associati al tumore. 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 possono alterare la risposta anti-tumorale sia localmente, nel sito tumorale, che a livello sistemico, negli organi linfoidi.

Cellule mieloidi soppressorie (MDSC)

Il termine cellule soppressorie di derivazione mieloide (abbreviato in MDSC) è stato recentemente adottato per descrivere, in 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).

In topo, cellule con fenotipo CD11b⁺Gr-1⁺ 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 a stimolazione antigenica acuta, ad esempio durante un'infezione, questa popolazione mieloide si espande transientemente a livello del midollo osseo e poi degli organi linfoidi secondari, dove probabilmente regola 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, però, la stimolazione antigenica prolungata provoca un accumulo massivo di cellule mieloidi che permangono negli organi linfoidi 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).

| . Tabella 1. Esempi di accumulo di MDSC in diversi situazioni patologiche sperimentali | | | |
|---|--|--------------------------------|---|
| Condizione | Fenotipo | Disfunzioni immunitarie | Bibliografia |
| TUMORE | | | |
| Tumori trapiantabili di colon carcinoma (CT26, C26), melanoma (B16), fibrosarcoma (C3, 15-12RM) | CD11b/Gr-1 | si | (Salvadori et al. 2000; Gabrilovich et al. 2001; Kusmartsev et al. 2000, 2005; Liu et al. 2003) |
| Tumore trapiantabile di carcinoma mammario (TS/A) e polmonare | CD11b/Gr-1/CD31 | si | (Young et al., 1996; Bronte et al. 1999; Bronte et al. 2000) |
| Tumore trapiantabile di colon carcinoma (C26-GM), carcinoma mammario (4T1), sarcoma (MCA203) | CD11b/Gr-1/F4/80/IL-4R α | si | (Gallina et al., 2006 ; Dolcetti et al., 2009) |
| Tumore trapiantabile di timoma (EL-4), linfoma (EG7, BW-Sp3) e colon carcinoma (MCA26) | CD11b/Gr-1/F4/80/CD115 ^{int} | si | (Kusmartsev et al., 2005; Movahedi et al., 2008; Huang et al., 2006) |
| Tumore trapiantabile di carcinoma ovarico | CD11b/Gr-1/CD80 | si | (Yang et al., 2006) |
| Tumore mammario spontaneo (BALB/neu T) | CD11b/Gr-1/CD31 | si | (Melani et al. 2003; Melani et al., 2007) |
| INFEZIONE | | | |
| <i>Candida Albicans</i> | CD11b/Gr-1/CD80 | si | (Mencacci et al. 2002) |
| <i>Trypanosoma Cruzi</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> | CD11b/Gr-1 | si | (Goni et al. 2002; Giordanengo, 2002; Ezernitchi et al., 2006) |
| <i>Schistosoma mansoni</i> | CD11b/Gr-1/CD16 | si | (Marshall et al. 2001) |
| STRESS IMMUNITARIO | | | |
| Superantigeni (Staphylococcal enterotoxin A) | CD11b/Gr-1/LFA-1 | si | (Cauley et al. 2000) |
| Schistosome oligosaccharide (Lacto-N-neotetraose) | CD11b/Gr-1/F4/80 | si | (Terrazas et al. 2001) |
| Vaccinazione con virus ricombinate | CD11b/Gr-1/CD31 | si | (Bronte et al. 1998; Bronte et al. 2000) |
| INFIAMMAZIONE CRONICA/AUTOIMMUNITA' | | | |
| Encefalomielite autoimmune sperimentale | CD11b/Ly6C ^{high} /F4/80/CD93 | si | (Zhu et al., JI 2007) |
| Uveoretinite autoimmune sperimentale | CD11b/Gr-1 | si | (Kerr et al., J Autoimm 2008) |
| Eczema cronico | CD11b/Gr-1/CD31 | si | (Marhaba et al., JI 2007) |
| Infiammazione cronica dell'intestino | CD11b/Gr-1 | si | (Haile et al., Gastroenterology 2008) |
| ALTRI | | | |
| Trattamento con ciclofosfamide (fase di recupero) | CD11b/Gr-1/CD31 | si | (Angulo et al. 2000; Pelaez et al. 2001) |
| Chimere midollari | CD11b/Gr-1/Ly6-C CD11b/Sca-1 | si | (Billiau et al. 2003 ; Johnson et al., 1998) |
| Reazione graft-versus-host | CD11b | si | (Bobe et al. 1999) |
| Stress traumatico | CD11b/Gr-1/CD31 CD11b/Gr-1 | si | (Makarenkova et al. 2006; Munera et al. 2010) |

Tabella 1. Esempi di accumulo di MDSC in diversi situazioni patologiche sperimentali

Immunosoppressione

L'inibizione degli effettori anti-tumorali è però la proprietà più rilevante e 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 (Marigo, Dolcetti et al. 2008). Come si vede in figura 1, nelle fasi iniziali di 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⁺ nei linfonodi drenanti, causando un'iniziale stato di tolleranza. 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 dipendente e 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 e altre popolazioni cellulari induce uno stato di immunosoppressione generalizzata, nei confronti non solo di linfociti T CD8⁺, ma anche di linfociti T CD4⁺, 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.

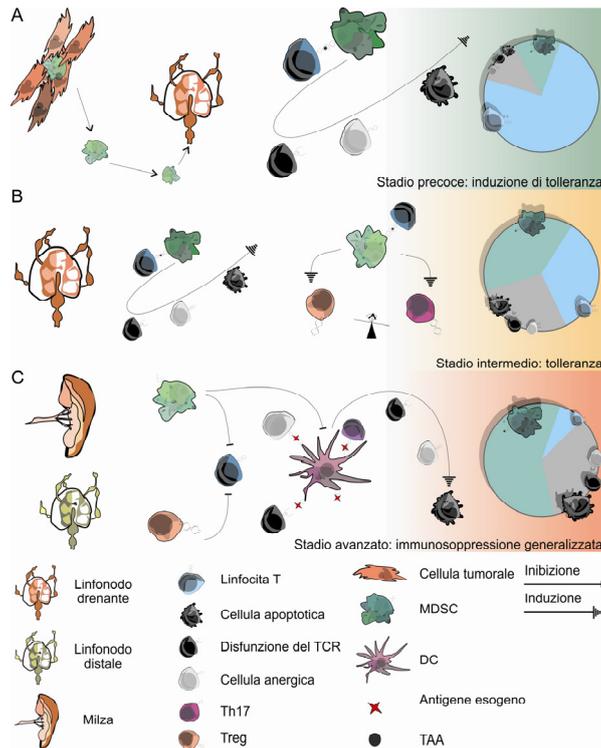


Figura 2. Modello di tolleranza e immunosoppressione indotte dallo sviluppo neoplastico. (A) Le MDSC vengono mobilizzate dai siti ematopoietici e infiltrano la massa tumorale in risposta a vari fattori solubili rilasciati dal tumore (TDSF); qui vengono in contatto con antigeni tumorali (TAA) e le MDSC presentanti tali antigeni si dirigono al linfonodo drenante. Qui le MDSC possono indurre tolleranza nei linfociti T CD8⁺, provocando disfunzioni del TCR, anergia o apoptosi. In questa fase, dato l'esiguo numero di MDSC, l'impatto sui linfociti 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 alla tolleranza. (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⁺, che su CD4⁺, 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 a urea e L-ornitina o ossido nitrico (NO) e L-citrullina, rispettivamente (Bogdan 2001). Questi enzimi rispondono a stimoli tradizionalmente descritti come antitetici e mutualmente esclusivi, ma ci sono evidenze che possano agire contemporaneamente ed in sinergia nella

popolazione MDSC (Kusmartsev, Nagaraj et al. 2005; Gallina, Dolcetti et al. 2006), anche se ancora manca la dimostrazione formale che la stessa cellula possa attivare allo stesso momento entrambe le proteine.

Arginasi ed ossido nitrico sintetasi

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 T helper (Th)2 (Munder, Eichmann et al. 1999), quali IL-4 e IL-13, da TGF- β (Boutard, Havouis et al. 1995) e GM-CSF (Jost, Ninci et al. 2003), a differenza dell'altra isoforma, arginasi 2 (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) dal fattore di trascrizione STAT6. NOS2, invece, è una delle tre isoforme (le altre sono NOS1, neuronale, e NOS3, endoteliale) di questo enzima, è espresso in macrofagi, neutrofili, eosinofili, cellule dendritiche e cellule NK murine. NOS2 viene indotto soprattutto dalla citochina Th1 IFN- γ , in particolare in combinazione con LPS, ma anche dalle citochine infiammatorie IL-1, TNF, IFN- α e IFN- β , che regolano diversi fattori di trascrizione, quali NF-kB, IFN-regulatory factor 1 e STAT1 (Bogdan 2001; Ganster, Taylor et al. 2001).

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 Th1 IFN- γ e TNF- α , o i lipopolisaccaridi batterici, 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, stimolano il rilascio di NO mediante l'attività di NOS2 ed inibiscono l'attività di ARG1 indotta da IL-4, IL-10 o IL-13. Al contrario, citochine Th2 quali IL-4, IL-10, IL-13, e TGF- β o glucocorticoidi, che inducono l'attivazione *alternativa* dei macrofagi (M2), essenziale per l'immunità umorale, le risposte allergiche e antiparassitarie, la riparazione dei tessuti e la fibrosi, inibiscono l'attività di NOS2 e inducono la sintesi di ARG1. Tuttavia, questa dicotomia maturativa, che è stata estesa talvolta a altre cellule accessorie di origine mieloide (macrofagi, DC e polimorfonucleati), in base all'equilibrio tra NOS e ARG 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).

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 ζ 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 e in pazienti con tumore (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 in fase G₀-G₁ 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 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.

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. L'ossido nitrico 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, Palmethofer et al. 2001). Nei linfociti T il 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 proapoptotico 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 segnalazioni attraverso vie indipendenti dalle caspasi (Mannick, Hausladen et al. 1999).

Cooperazione ARG1 e NOS2

Come detto in precedenza, ARG e NOS sono generalmente considerati come enzimi antitattici; tuttavia, esistono basi biochimiche che possono spiegare la cooperazione tra i due enzimi. Infatti, in condizioni di deplezione di arginina citosolica a causa dell'attività sovra-fisiologica dell'arginasi presente nelle MDSC, l'attività di NOS2 viene modificata inducendo la produzione di anione superossido (O_2^-) dal suo dominio reduttasico, oltre a NO (Xia and Zweier 1997; Xia, Roman et al. 1998; Bronte, Serafini et al. 2003). L' O_2^- reagisce poi con altre molecole generando intermedi reattivi dell'azoto, noti anche come RNOS (reactive nitrogen-oxide species), tra cui i perossinitriti $ONOO^-$ e 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, pertanto, da messaggeri intra- e inter-cellulari e indurre modifiche post-traduzionali, mediante la nitratura di residui di tirosina, cisteina, metionina e triptofano delle proteine, influenzando 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, possono indurre apoptosi in linfociti T umani (con linfociti T attivati più suscettibili a questo effetto di quelli "resting") impedendo la fosforilazione di importanti proteine di segnalazione mediante la nitratura di residui tirosinici (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 recettore (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 ARG e NOS 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). 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 target 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 espansa di granulociti a bassa densità che producono H_2O_2 , 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 BCL-2 e l'aumento dei livelli di FasL mediato da NF- κ B (Hildeman, Mitchell et al. 2003).

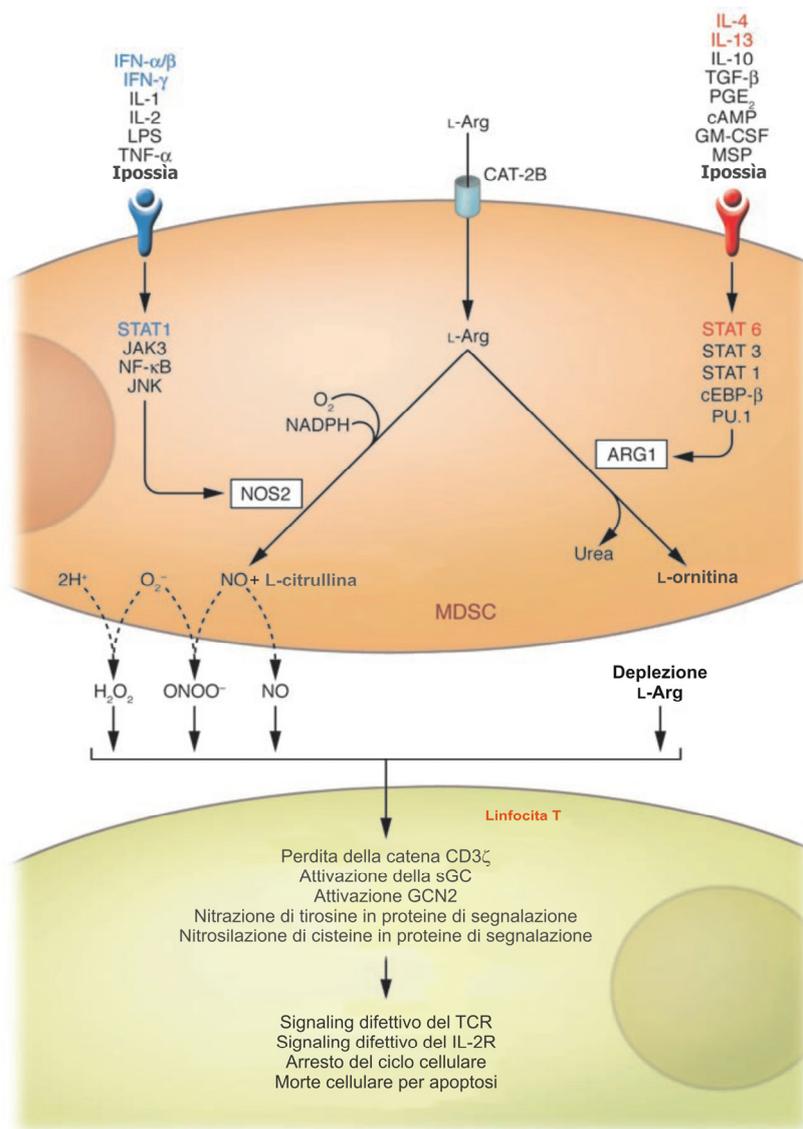


Figura 3. Effetti inibitori del metabolismo della L-Arg delle MDSC su linfociti T attivati.

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 (O₂⁻, H₂O₂, 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 ζ 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 di macrofagi associati al tumore (Sinha, Clements et al. 2007). In un diverso modello tumorale, invece, le MDSC vengono indotte da IL-13 a rilasciare TGF- β , 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 CD8⁺, queste cellule agiscono anche inibendo l'attività di altri effettori immuni, quali linfociti T CD4⁺ (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 macrofagi associati al tumore. 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- γ che coinvolge il rilascio di TGF- β e IL-10 da parte delle MDSC (Huang, Pan et al. 2006). Lo stesso gruppo ha poi dimostrato che l'attivazione da parte di IFN- γ comporta anche un aumento della molecola CD40 sulle MDSC, cruciale per l'induzione di immunosoppressione e per l'attivazione dei 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 induzione antigene-specifico dei Treg mediato dalle MDSC e dipendente da arginasi (Serafini, Mgebrouff 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 macrofagi associati al tumore, 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 misto di espressione genica prevalentemente M2 ma con un set di geni

indotti da IFN- γ (tipicamente M1), alle citochine prodotte, alle funzioni pro-tumorali di immunoregolazione, induzione di angiogenesi e metastasi. Alcune evidenze suggeriscono che le MDSC possano differenziare in macrofagi soppressivi (Kusmartsev, Nagaraj et al. 2005; Van Ginderachter, Meerschaut et al. 2006) e che possano costituire un continuum di uno stesso programma differenziativo mieloido indotto da fattori rilasciati dal tumore (Sica and Bronte 2007).

Eterogeneità fenotipica delle MDSC

La popolazione MDSC è eterogenea e comprende cellule mieloidi diverse a stadi maturativi differenti. Nel topo, oltre ai marcatori CD11b e Gr-1, le MDSC condividono, generalmente, l'espressione di altri marcatori, come F4/80^{int}CD11c⁻MHC II^{low}. 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 molto nei diversi tumori. Infatti, il tumore rilascia un insieme di fattori che possono essere diversi in dipendenza dell'istotipo tumorale, della localizzazione anatomica e delle dimensioni della massa neoplastica. Allo scopo di identificare una frazione più propriamente soppressiva all'interno della macropopolazione MDSC sono stati proposti alcuni marcatori, come la catena α del recettore per IL-4 e IL-13 (IL-4R α) (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, quindi poco adatte ad essere utilizzate come marker generali delle MDSC.

E' ormai noto e confermato da diversi gruppi che l'anticorpo anti-Gr-1, comunemente usato per studiare queste cellule, permetta di distinguere almeno due frazioni cellulari in base al suo livello di espressione, una che esprime il marcatore ad alta intensità (Gr-1^{high}), prevalentemente costituita da granulociti maturi e immaturi, ed una seconda a minor espressione (Gr-1^{int/low}), 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). Inoltre, l'anticorpo anti-Gr-1 riconosce, con diversa specificità, due molecole della famiglia genica Ly6; Ly6G e Ly6C, che marcano preferenzialmente e rispettivamente cellule granulocitarie e monocitarie. (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 con tumore sulla base dell'espressione di queste due molecole, ottenendo due frazioni denominate, sulla base della loro somiglianza morfologica, MDSC granulocitiche (G-MDSC) e MDSC monocitiche (M-MDSC). Le G-MDSC sono descritte come cellule CD11b⁺Gr-1^{high}Ly6G⁺Ly6C^{low/int}, mentre le M-MDSC 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. (Youn and Gabrilovich) (Movahedi, Williams et al. 2008).

Nuovi studi hanno però riesaminato il ruolo relativo di queste frazioni cellulari, utilizzando un criterio di separazione basato sul livello 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 (Dolcetti, Peranzoni et al.), è stato 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.

E' stato osservato che esistono delle corrispondenze tra queste diverse classificazioni fenotipiche. In modelli tumorali è stata infatti riscontrata una stretta analogia tra le CD11b⁺ Gr-1^{high} e le CD11b⁺ Gr-1^{int}, e le sottopopolazioni G-MDSC e M-MDSC. A supporto di tale visione, è stato dimostrato che l'inibizione di M-CSFR, espresso ad elevati livelli dalle M-MDSC, riduce fortemente il reclutamento di CD11b⁺Gr-1^{low}Ly6C^{high} M-MDSC ma non produceva alcun effetto su CD11b⁺Gr-1^{high}Ly6C^{low} G-MDSC nel tumore (Priceman, Sung et al.).

Una simile distinzione tra frazioni monocitiche e granulocitiche è descritta anche per MDSC che infiltrano 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⁺CX₃CR1⁺ con marcatori sia di macrofagi M1 che M2, e per il resto da cellule Gr-1^{high}F4/80^{low} (Umemura, Saio et al. 2008). Un altro lavoro ha evidenziato come la componente granulocitica viene reclutata al sito tumorale dal frammento C5a del complemento, mentre quella monocitica non risente di questo effetto ma è indotta dalla stessa molecola a produrre ROS e RNS (Markiewski, DeAngelis et al. 2008).

Eterogeneità funzionale delle MDSC

La suddivisione morfologica e fenotipica delle MDSC nei gruppi, G-MDSC e M-MDSC di cui si è parlato sopra ha anche un significato funzionale; queste due popolazioni mieloidi, infatti, sopprimono la risposta immunitaria attraverso meccanismi diversi. Le G-MDSC, che utilizzano i ROS per indurre tolleranza immunitaria, richiedono uno stretto contatto cellula-cellula con i linfociti T. Questa esigenza si manifesta in un'interazione di tipo antigene-specifica tra le MDSC e le cellule T (Nagaraj, Gupta et al. 2007). Al contrario, le M-MDSC che usano principalmente meccanismi di up-regolazione di NO e arginasi, produzione di citochine immunosoppressive, sopprimono efficacemente una risposta immunitaria antigene-indipendente, senza richiedere il contatto diretto cellula-cellula.

Dati provenienti da laboratori diversi concordano nel suggerire che le M-MDSC esercitano un'azione più potente rispetto alle G-MDSC (Dolcetti, Peranzoni et al.; Priceman, Sung et al.;

Movahedi, Guilliams et al. 2008; Youn, Nagaraj et al. 2008). Il fatto che queste sottopopolazioni, dotate di un potenziale immunosoppressivo differente, si accumulano in quantità diverse negli organi linfoidi secondari potrebbe spiegare il motivo per cui in questi organi viene indotta una tolleranza di tipo antigene-specifica, mentre le cellule T mantengono la loro capacità di rispondere a stimoli non-specifici (Fricke, Mirza et al. 2007; Monu and Frey 2007). Inoltre, nel sito tumorale, il rapporto tra le G-MDSC e le M-MDSC è molto più basso di quello che si riscontra negli organi linfoidi e questo può influenzare la natura della funzione soppressoria nel tumore. E' ipotizzabile che le citochine rilasciate dal tumore siano responsabili del reclutamento preferenziale delle M-MDSC nel sito tumorale. Oppure il microambiente tumorale, caratterizzato da ipossia e pH basso, potrebbe non permettere la sopravvivenza delle G-MDSC.

Come già discusso sopra, nel nostro laboratorio sono state separate mediante un protocollo immunomagnetico le tre frazioni Gr-1^{high}, Gr-1^{int} e Gr-1^{low} da milza di topi con tumore. La popolazione Gr-1^{high}, costituita prevalentemente da G-MSDC, ha un debole effetto soppressivo sulla risposta T antigene-specifica o allogenica. Al contrario, la frazione Gr-1^{int}, che comprende principalmente M-MDSC, sviluppa una potente azione soppressiva contro linfociti T, così come la frazione Gr-1^{low}. {Dolcetti, #99; Greifenberg, 2009 #109.

Inoltre, mentre la popolazione Gr-1^{int} è sempre soppressiva, sia in studi *in vitro* che *in vivo* le cellule Gr-1^{high} perdono la capacità di sopprimere *in vivo* in seguito a trasferimento adottivo.

Studi recenti mostrano che se MDSC derivate dal tumore vengono coltivate in assenza di fattori solubili derivati dal tumore (TDSF) o vengono trasferite in animali sani, esse si differenziano in macrofagi e DC mature e perfettamente funzionali. In presenza di fattori tumorali ed in ospiti con tumore la situazione cambia notevolmente. MDSC isolate da milza di topi con tumore, in presenza di fattori solubili tumorali si differenziano in macrofagi immunosoppressivi {Narita, 2009 #233}. Inoltre, è stato osservato che MDSC isolate da milza di animali con tumore differenziano in macrofagi associati al tumore in grado di esercitare una potente azione immunosoppressiva se trasferite in animali "recipiente" con tumore (Kusmartsev and Gabrilovich 2005).

Microambiente tumorale: fattori che espandono le MDSC

L'espansione ed il reclutamento di MDSC al sito tumorale possono essere indotti da TDSF che alterano profondamente la mielopoiesi, inducendo la mobilitazione e l'attivazione di cellule mieloidi. Questo concetto 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 e all'induzione di una popolazione mieloide con attività soppressoria 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 (granulocyte/macrophage colony stimulating factor) rilasciati dal tumore siano in grado di indurre MDSC sia *in vivo* che *in vitro* su 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, da sola, è in grado di indurre la popolazione soppressoria CD11b⁺Gr-1⁺ quando rilasciata dal tumore stesso. 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 e il numero di cellule CD34⁺ infiltranti la massa tumorale primaria. I pazienti con tumori che producevano alte quantità di GM-CSF o avevano alto contenuto di CD34⁺ 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⁺ rimaneva 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 γ -irradiati ingegnerizzati per rilasciare questa citochina sono impiegati per reclutare ed espandere APC professionali, che presentino 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, sia come adiuvante di vaccini antitumorali e, insieme al G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), per mobilitare cellule progenitrici dal midollo osseo al sangue periferico (Peters, Rosner et al. 1993; Gazitt 2002) in associazione con farmaci chemioterapici, per aumentare la citotossicità verso leucemie (Archimbaud, Fenaux et al. 1993).

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 le MDSC 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 sistemico 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 subcutaneo, sia come prodotto di cellule tumorali autologhe o allogene ingegnerizzate a rilasciare la citochina (Parmiani, Castelli et al. 2007). In questo studio, 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 con fenotipo monocitario CD14⁺HLA-DR^{-/lo}, 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, effetto 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*

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 mieloidale con azione immunosoppressiva e fenotipo simile a quello di MDSC isolate dalla milza di topi portatori di tumore (Marigo, Bosio et al.; Morales, Kmieciak et al.; Lutz, Kukutsch et al. 2000; Rossner, Voigtlander et al. 2005).

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⁺ (Gabrilovich, Chen et al. 1996; Gabrilovich, Ishida et al. 1998). In un modello di carcinoma mammario simile a quello umano, 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).

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 infatti in grado, oltre che di ridurre il numero di cellule CD11b⁺Gr-1⁺CD115⁺ nel midollo osseo degli animali portatori di tumore, di rallentare la crescita tumorale e l'angiogenesi, ristabilire la proliferazione di linfociti T *in vitro* e di aumentare l'efficacia di un trattamento immunoterapeutico *in vivo* (Pan, Wang et al. 2008). 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 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 arginasi 1 nelle MDSC infiltranti il tumore (Rodriguez, Hernandez et al. 2005). L'inibitore di COX2 Celecoxib, in modo simile, 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 β /IL-6/M-CSF

Un altro mediatore infiammatorio che si è dimostrato in grado di causare 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 probabilmente mediata da IL-6, 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 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 al 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 al sito tumorale, garantendo perciò il mantenimento di un microambiente immunosoppressivo (Sinha, Okoro et al. 2008). STAT3 sembra responsabile dell'aumento di S100A8/S100A9, che agiscono impedendo la completa maturazione delle MDSC mediante l'incremento di ROS (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⁺ isolate dal sangue periferico di pazienti con carcinoma metastatico della prostata: le due molecole proteggono queste cellule dall'apoptosi inducendo proteine anti-apoptotiche e 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⁺ 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 esosomi derivati da una linea umana di carcinoma mammario. Almeno in topo, l'alterazione del differenziamento mieloido 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⁺Gr-1⁺ 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- β contenuti negli esosomi, sembra correlare direttamente con lo stadio del tumore da cui le microvescicole derivano (Xiang, Poliakov et al. 2009).

Fattori rilasciati dal tumore o da altre cellule del microambiente tumorale sono necessari, oltre che per il reclutamento di MDSC, anche per attivare in queste cellule un programma soppressivo; è stato infatti osservato che cellule CD11b⁺Gr-1⁺ isolate da animali sani sono presenti in percentuali ridotte e generalmente non sono in grado di inibire la risposta immune *in vitro*, se non a concentrazioni molto elevate di cellule (Dolcetti, Peranzoni et al.; Kusmartsev, Nefedova et al. 2004; Yang, Cai et al. 2006). 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- κ B. Il principale mediatore conosciuto è l'IFN- γ , 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- γ 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 α . 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 per la forte induzione del rilascio della citochina immunosoppressiva TGF- β da parte delle MDSC (Terabe, Matsui et al. 2003).

Un mediatore infiammatorio, presente in elevate concentrazioni nel microambiente tumorale, (Ohta PNAS 2006, Pellegatti PLOS ONE 2008), che ha suscitato un crescente interesse tra gli immunologi

nell'ultimo decennio è l'ATP. Recentemente è emerso che il rilascio di questo nucleotide da parte di cellule tumorali apoptotiche o cellule danneggiate può stimolare le prime fasi di attivazione della risposta immunitaria, agendo sul reclutamento di fagociti, come monociti, macrofagi e cellule dendritiche (Elliott, Chekeni et al. 2009). Inoltre, dall'idrolisi di ATP, si ottiene l'adenosina che, al contrario svolge una potente azione anti-infiammatoria (Bours, Swennen et al. 2006; Fredholm 2007).

ATP come messaggero extracellulare

L'adenosintrifosfato (ATP) è una molecola ad alta energia che svolge un ruolo fondamentale nel metabolismo della cellula. Il concetto che l'ATP, oltre al suo ruolo intracellulare di sorgente energetica, potesse svolgere un'importante funzione anche come messaggero extracellulare ha impiegato non poco tempo ad essere accettato dalla comunità scientifica. Nel 1970, Burnstock fu il primo a descrivere l'ATP rilasciato dai nervi non-adrenergici come una sostanza trasmittente, ed a formulare l'ipotesi della neurotrasmissione mediata da recettori purinergici (Burnstock 1972). Trenta anni dopo, in seguito al clonaggio ed alla caratterizzazione dei recettori di superficie di ATP e adenosina, la via di segnalazione purinergica è divenuta un concetto ben consolidato e, attualmente, costituisce un campo di ricerca in grande espansione.

Anche se i primi studi si sono focalizzati sul ruolo dei recettori purinergici nella neurotrasmissione, è poi emerso chiaramente come l'ATP extracellulare ricoprisse un ruolo importante in tutti quei sistemi che richiedevano un efficiente contatto cellula-cellula, come il sistema immunitario. Negli ultimi dieci anni, l'interesse per gli effetti svolti da purine e pirimidine extracellulari non ha più riguardato solamente la risposta infiammatoria, ma anche pathway biologici più generali come la sopravvivenza, la proliferazione, la differenziazione e la motilità cellulare. E' ormai chiaro che il rilascio di nucleotidi purinici e pirimidinici rappresenta un mezzo di comunicazione intercellulare ubiquitario usato da tipi cellulari diversi, in vari processi biologici, che si è conservato durante l'evoluzione, come attestato dalla presenza dei recettori purinergici in invertebrati (Fountain, Parkinson et al. 2007) e piante (Kim, Sivaguru et al. 2006).

Recettori purinergici

I recettori purinergici sono stati originariamente classificati sulla base della loro farmacologia e funzione in recettori P1, selettivi per l'adenosina, e recettori P2 selettivi per ATP e ADP. I recettori P2 sono stati successivamente distinti in recettori ionotropici, P2X e recettori metabotropici, P2Y (Ralevic and Burnstock 1998). Attualmente sono stati identificati quattro sottotipi di recettori P1 (A1, A2A, A2B e A3), sette sottotipi di recettori P2X e otto sottotipi P2Y (Fig. 5).

I recettori P2Y contengono sette domini transmembrana con le estremità N-terminale e C-terminale rispettivamente nella porzione extra ed intracellulare. Questi recettori si dividono in 5 sottotipi associati alle proteine G_q/G_{11} (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁), che generalmente attivano il pathway della fosfolipasi C (PLC) e inositolo trifosfato (IP3), e tre sottotipi associati alle proteine G_i/G_o (P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄), che inibiscono l'adenilato-ciclastasi e modulano i canali ionici (Abbraccio et al 2009).

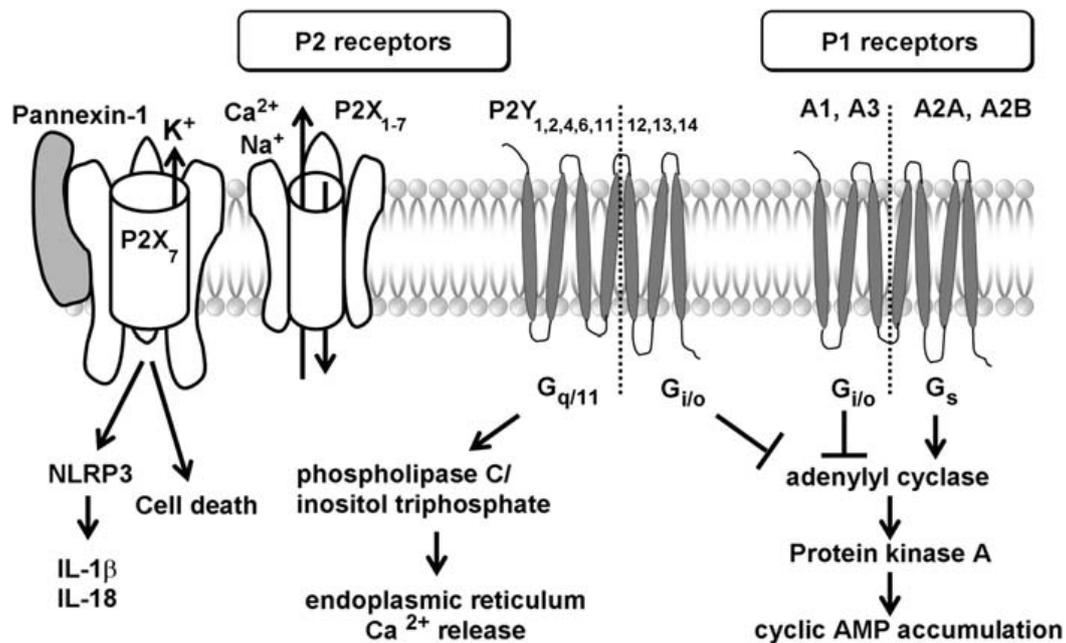


Figura 5. Signaling dei recettori dell'adenosina trifosfato (ATP) e dell'adenosina.

L'ATP extracellulare lega i recettori metabotropici P2Y e i recettori ionotropici P2X. I recettori P2Y si suddividono in sottotipi associati alle proteine G_q/G_{11} che attivano il pathway della fosfolipasi C e dell'inositolo trifosfato e in sottotipi associati alle proteine G_i/G_o , che inibiscono l'adenilato-ciclastasi. Il P2X7 è un recettore atipico che forma canali ionici a basse concentrazioni di ATP, attivando l'NLRP3 inflammasoma attraverso l'efflusso di K^+ ed il reclutamento dell'emicanale pannessina 1 e inducendo la morte cellulare ad elevate concentrazioni di ATP. L'adenosina extracellulare lega i recettori A1 e A3 associati alle proteine $G_{i/o}$ e i recettori A2A e A2B associati alla proteina G_s . I recettori A2A e A2B aumentano i livelli di AMP ciclico intracellulare, al contrario i recettori A1 e A3 li riducono.

I recettori P2X sono formati da tre subunità; ciascuna consiste di due regioni transmembrana collegate da un esteso loop extracellulare in cui si trovano dieci residui cisteinici che formano dei ponti disolfuro, tre probabili siti di N-glicosilazione ed il sito di legame dell'ATP. I domini amino- e carbossi-terminale sono intracellulari. Queste subunità possono formare recettori omomerici (P2X₁₋₅ e P2X₇) o eteromerici (P2X_{1/2}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6} e P2X_{4/6}).

I recettori P2X sono canali cationici non selettivi. In condizioni fisiologiche, l'attivazione del recettore P2X permette l'ingresso di ioni Na^+ e Ca^{2+} e fa uscire lo ione K^+ attraverso la membrana cellulare, questo porta alla depolarizzazione della membrana plasmatica e ad un aumento nella concentrazione intracellulare di Na^+ e Ca^{2+} .

Il recettore omomeroico P2X₇ è un recettore purinergico atipico; esso contiene una coda carbossi-terminale più lunga ed un numero di polimorfismi e varianti di splicing (Gunosewoyo, Coster et al. 2007; Wu, Lin et al. 2009). L'attivazione dei recettori P2X₇ è finemente regolata dai livelli di ATP extracellulare. Mentre basse concentrazioni di ATP stimolano i canali ionici del P2X₇ a diventare permeabili a piccoli ioni, alte concentrazioni di ATP permettono la formazione di un poro permeabile a molecole di dimensioni non superiori a 900kDa (Khakh and North 2006).

I recettori P1 sono quattro distinti recettori associati alla proteina G. L'adenosina extracellulare attiva i recettori A1 e A3 associati alle proteine G_{i/o}, che producono una diminuzione dei livelli di AMP ciclico (cAMP) intracellulare e i recettori A2A e A2B associati alla proteina G_s, che, al contrario, aumentano i livelli di cAMP attraverso l'attivazione dell'adenilato-ciclastasi (Hasko and Cronstein 2004).

ATP extracellulare nell'immunità

Un numero crescente di evidenze sperimentali ha dimostrato che l'ATP extracellulare ed i recettori P2 svolgono un ruolo chiave nelle primissime fasi di attivazione della risposta immunitaria. Ad esempio, la maturazione ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie della famiglia dell'interleuchina-1 è mediato dal complesso attivante l'enzima caspasi 1, definito come inflammosoma. Questo complesso multiproteico è a sua volta attivato da fattori derivanti da agenti patogeni o dall'ospite come il muramil dipeptide, i cristalli di acido urico ed il pirofosfato di calcio (Martinon, Petrilli et al. 2006) che interagiscono direttamente con una componente centrale dell'inflammasoma, la proteina NALP3/CIAS1/cryopirin. L'ATP extracellulare attraverso il recettore P2X₇ è risultato essere il più potente stimolo fisiologico per l'attivazione dell'inflammasoma NALP3-mediata (Sutterwala, Ogura et al. 2006) che porta al processamento ed alla secrezione delle citochine IL-1 α , IL-1 β , e IL-18.

L'attivazione del recettore P2Y₂ regola la chemotassi di fagociti immunitari, come macrofagi e neutrofili, in modi diversi. Nei monociti/macrofagi il rilascio di ATP extracellulare da parte di cellule apoptotiche agisce direttamente come un segnale "find me" (Elliott, Cheleni et al. 2009). Diversamente, i neutrofili circolanti non migrano verso gradienti di ATP, ma a loro volta lo rilasciano in risposta a chemoattrattori che mediante l'attivazione retroattiva dei recettori P2Y₂ e A3, amplificano i segnali chemotattici e orientano la cellula (Chen, Corriden et al. 2006). Entrambi

i tipi cellulari utilizzano il signaling del P2Y₂, ma nei macrofagi esso non stimola l'amplificazione dei segnali chemotattici.

La principale caratteristica dei segnali di pericolo risiede nella loro capacità di attivare le cellule dendritiche e guidare la loro maturazione. Le cellule dendritiche sono le APC più efficienti nell'attivare i linfociti T naïve, quindi sono elementi chiave nelle prime fasi della risposta immunitaria. Le cellule dendritiche risiedono nei tessuti come cellule immature, una volta attivate da svariati agenti extracellulari, quali patogeni, citochine e neurotrasmettitori, esse maturano e migrano nei linfonodi dove differenziano ed espandono i linfociti T (Cella, Sallusto et al. 1997; Banchereau and Steinman 1998).

E' stato visto che l'esposizione cronica a basse concentrazioni di ATP provoca una modulazione della maturazione delle cellule dendritiche, potenziando la loro abilità nel localizzarsi nei linfonodi e di iniziare una risposta immunitaria di tipo Th2 piuttosto che Th1. Al contrario, alte dosi di ATP, in associazione a patogeni batterici, stimolano fortemente la secrezione di citochine infiammatorie e se la stimolazione è duratura la cellula muore (Coutinho-Silva, Persechini et al. 1999; Ferrari, La Sala et al. 2000). E' da notare che l'ATP è incapace di guidare il rilascio di IL-1 β in fagociti che non sono stati attivati con LPS, rinforzando il ruolo dell'ATP come segnale di pericolo che agisce in concerto con batteri patogeni per dare il via all'infiammazione. Per altro, l'incapacità dell'LPS di guidare la secrezione della IL-1 β in assenza di ATP supporta ulteriormente l'idea che fattori batterici rappresentano uno stimolo insufficiente in assenza di segnali di pericolo rilasciati in maniera endogena.

I nucleotidi modellano la risposta immunitaria anche esercitando effetti differenziali sul reclutamento delle cellule dendritiche. L'ATP extracellulare, attraverso l'attivazione di recettori P2Y, rappresenta un potente stimolo chemotattico per cellule dendritiche immature (Idzko, Dichmann et al. 2002). Al contrario, Cellule DCs mature esposte all'ATP possiedono un diminuita capacità migratoria (Schnurr, Toy et al. 2003). In questo modo l'accumulo di ATP nel sito di infezione permetterebbe il reclutamento delle DCs immature e l'inibizione transiente della migrazione delle DCs mature potrebbe prolungare l'incontro con l'antigene.

In conclusione, si può affermare che cellule morenti, danneggiate o stressate rilasciano ATP, generando un segnale molto precoce e sensibile di pericolo. L'ATP extracellulare allerta il sistema immunitario di un imminente pericolo dovuto a cause esogene o endogene, plasmando la risposta immunitaria a seconda della quantità e della durata del segnale. Un massivo rilascio di ATP nello spazio extracellulare agisce come potente co-stimolo per la secrezione di citochine infiammatorie della famiglia dell'IL-1 e potrebbe anche portare ad un aumento del danno tissutale esercitando un diretto effetto citotossico. Un rilascio minore ma duraturo potrebbe avere un effetto meno

drammatico e più sottile mediante la stimolazione della chemiotassi dei fagociti, l'upregolazione dei recettori delle chemochine e il differenziamento delle cellule dendritiche (Fig. 6).

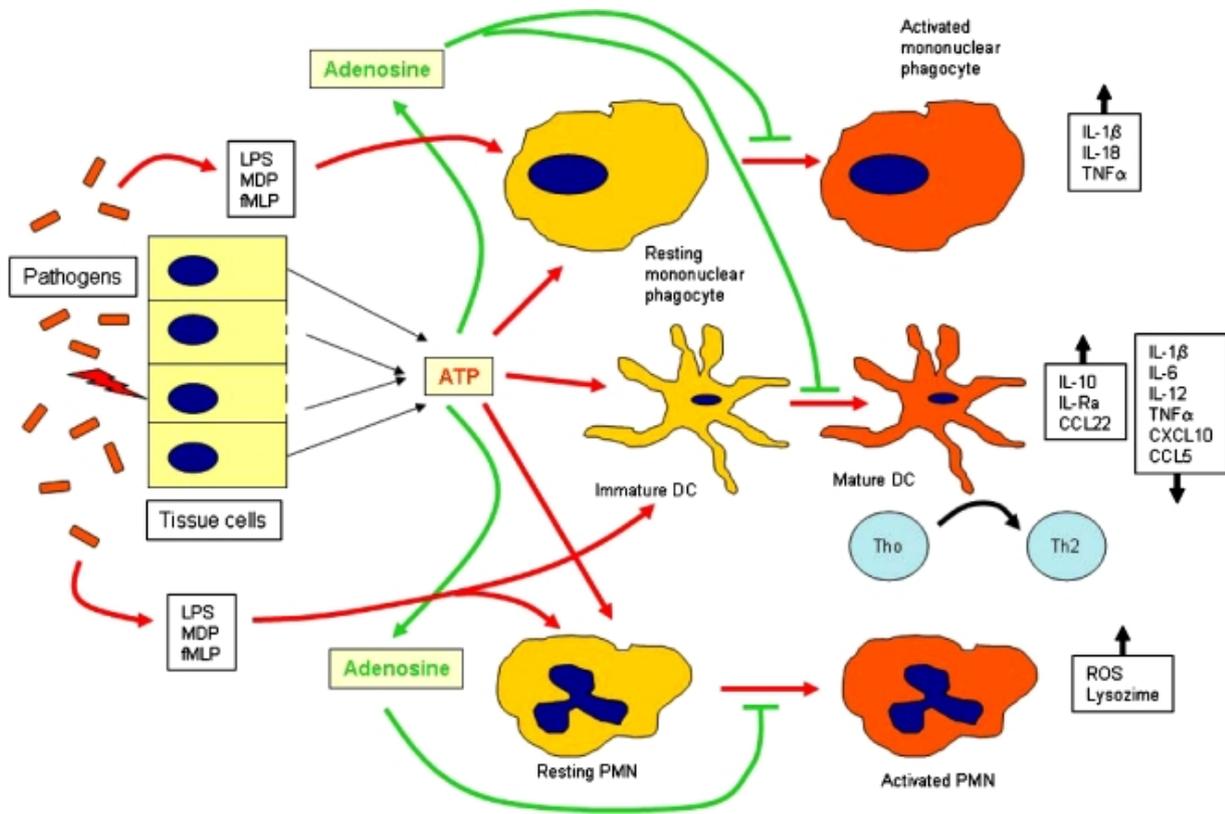


Figura 6. Signaling purinergico nell'attivazione/deattivazione della risposta immunitaria innata.

Patogeni rilasciano fattori che attivano l'immunità innata direttamente [lipopolisaccaride (LPS), muramil dipeptide (MDP), formil-metionin-leucin-fenilalanina (fMLP)] o indirettamente causando danno o stress alle cellule ospiti (ATP). L'ATP extracellulare che si accumula nel sito di infiammazione modula l'attività dei fattori patogeni in diversi modi (freccie rosse): L'ATP esercita un sinergico effetto proinfiammatorio aumentando il rilascio di citochine (IL-1 β , IL-18, TNF α) da parte di fagociti mononucleari attivati da fattori patogeni, o stimolando il rilascio di fattori battericidi (lisozima) e la sintesi di specie reattive dell'ossigeno (ROS) dai PMN. Queste risposte sono mediate attraverso il recettore P2X₇ ed altri recettori P2. Sulle cellule dendritiche (DCs), alte concentrazioni d ATP causano una forte attivazione pro infiammatoria; un'esposizione cronica a basse concentrazioni guidano la maturazione delle DCs verso un fenotipo che favorisce lo sviluppo di una risposta di tipo Th2. Gli effetti modulatori dell'ATP sulle DCs sono principalmente mediati dal recettore P2Y₁₁. DCs LPS-attivate e ATP-stimolate rilasciano citochine anti-infiammatorie, come IL-10, IL-Ra e chemochine che guidano il reclutamento di linfociti Th2, come CCL22, down modulando la secrezione di IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α e chemochine come CCL5 e CXCL10 che reclutano preferenzialmente cellule Th1. L'ATP viene degradato ad opera di una ecto-ATPase di membrana (CD39), generando adenosina che, attraverso i recettori A2A esercita un profondo effetto anti-infiammatorio (freccie verdi).

Adenosina extracellulare nell'immunità

La conversione dell'ATP extracellulare ad adenosina attraverso l'attività enzimatica delle nucleotidasi di membrana, CD39 e CD73, agisce come un meccanismo a feed-back negativo che previene risposte immunitarie eccessive. Gli effetti immunosoppressivi della adenosina sono riassunti nella figura 7.

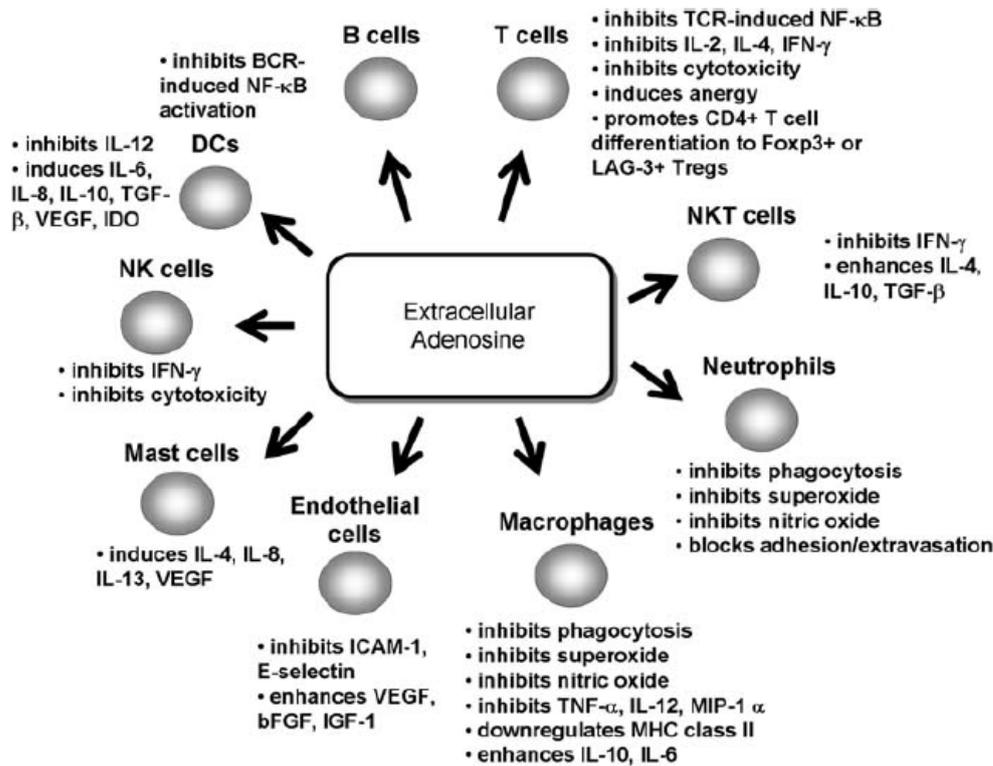


Figura 7. Effetti immunosoppressivi dell'adenosina extracellulare.

La fosfoidrolisi dell'adenosina trifosfato ad adenosina avviene attraverso le ectonucleotidasi CD39 e CD73 e agisce come potente meccanismo a feed-back negativo di soppressione della risposta immunitaria innata e adattativa-

L'adenosina esercita il suo effetto anti-infiammatorio, agendo su molteplici cellule immunitarie:

- **Fagociti.** Nei macrofagi l'adenosina inibisce la fagocitosi, la produzione del superossido e NO ((Eppell, Newell et al. 1989; Hasko, Szabo et al. 1996), il rilascio di TNF- α , l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II e la produzione di IL-12 (Hasko, Kuhel et al. 2000). Nei neutrofili, l'adenosina blocca la degranolazione, l'adesione alle cellule endoteliali e la produzione di superossido ((Cronstein, Daguma et al. 1990; Firestein, Bullough et al. 1995; Bouma, Jeunhomme et al. 1997).

- **Cellule dendritiche.** L'adenosina extracellulare aumenta la chemiotassi delle cellule dendritiche immature di derivazione monocitica, ma inibisce la produzione di IL-12 che segue l'attivazione di queste cellule (Panther, Idzko et al. 2001; Panther, Corinti et al. 2003). Anche le cellule dendritiche immature plasmacitoidi migrano verso un gradiente di adenosina (Schnurr, Toy et al. 2004), una volta mature, subiscono un'alterazione del profilo di espressione dei recettori adenosinici (switch da recettori associati alla proteina G_i a G_s) che risulta nella perdita della risposta chemiotattica e nella inibizione nella secrezione citochimica (Schnurr, Toy et al. 2004). Recentemente è stato studiato l'effetto della adenosina extracellulare sul differenziamento di cellule dendritiche umane a partire dai monociti del sangue. L'attivazione dei recettori A2B sui monociti interferisce con il differenziamento delle cellule dendritiche verso una popolazione che produce alti livelli di VEGF, il-8, IL-6, IL-10, COX-2, TGF- β e IDO (Novitskiy, Ryzhov et al. 2008).
- **Linfociti B.** La stimolazione dei recettori A2A inibisce l'attivazione di NF- κ B mediata dal recettore delle cellule B (BCR), attraverso un aumento dell'attività della protein chinasi A (Minguet, Huber et al. 2005). Inoltre, recenti evidenze associano lo switch isotipico delle cellule B, in particolare di una popolazione di cellule B della memoria, ad una upregolazione del CD73, ectonucleotidasi essenziale per la generazione dell'adenosina (Anderson, Tomayko et al. 2007). In supporto di questo modello è stato osservato che le cellule B della memoria hanno una aumentata espressione dei geni coinvolti nel signaling dell'adenosina, incluso il recettore A2A, rispetto alle cellule B naïve (Tomayko, Anderson et al. 2008). Questi studi suggeriscono che lo switch isotipico delle cellule B, in particolare delle cellule B memoria, usano recettori dell'adenosina per controllare la ristimolazione antigenica.
- **Linfociti T.** L'adenosina è un importante inibitore delle funzioni delle cellule T. Come per le cellule B, l'adenosina inibisce l'attivazione dell' NF- κ B indotta dal recettore delle cellule T (TCR) ((Majumdar and Aggarwal 2003). Il recettore A2A regola in maniera predominante le funzioni dei linfociti T; esso è significativamente upregolato durante l'attivazione delle cellule T e ne inibisce profondamente la citotossicità, la produzione di citochine (Ohta, 2009) e la capacità proliferativa (Zhang, Conrad et al. 2004; Deaglio, Dwyer et al. 2007). I linfociti T stimolati in presenza di un agonista del recettore A2A mantengono un fenotipo soppresso anche dopo l'arimozione dell'agonista (Ohta, Ohta et al. 2009). La stimolazione dei recettori A2A inibiscono lo sviluppo di entrambe le risposte Th1 e Th2, *in vitro* ed *in vivo* (Csoka, Himer et al. 2008). I linfociti ,in presenza di recettori A2A attivati, non proliferano e non producono IFN- γ una volta ristimolati, rimanendo essenzialmente anergici (Zarek, Huang et al. 2008). Inoltre, studi *in vivo* hanno dimostrato che l'attivazione dei

recettori adenosinici A2A guidano il differenziamento delle cellule T CD4⁺ verso cellule Treg Foxp3⁺, probabilmente a causa di un concomitante aumento di TGF-β e riduzione di IL-6 (Zarek, Huang et al. 2008).

- **Cellule T regolatorie.** Le cellule Treg Foxp3⁺ ricoprono un ruolo fondamentale nel controllo delle risposte autoimmunitarie e nella immunità tumorale e svolgono la loro funzione immunosoppressiva attraverso vari meccanismi. Uno di questi meccanismi è rappresentato dall'attività svolta dagli enzimi ectonucleotidasici CD39 e CD73, quindi dalla formazione di adenosina ((Deaglio, Dwyer et al. 2007). Nei topi, le Tregs Foxp3⁺ esprimono alti livelli di entrambi gli enzimi, upregolano il CD73 in seguito ad attivazione e loro funzione regolatoria dipende in parte da questi enzimi e dal nucleotide che essi generano (Ring, Enk et al.). Nell'uomo le Tregs esprimono il CD39, che viene upregolato in seguito all'attivazione delle cellule regolatorie; l'espressione del CD73 invece non è chiara. Tuttavia, l'inibizione del CD73 riduce l'immunosoppressione mediata dalle Treg umane *in vitro* (Mandapathil, Hildorfer et al.). Inoltre, da un recente studio anche l'ATP extracellulare è stato identificato come molecola in grado di attivare le Tregs (Ring, Enk et al.), sottolineando come il rilascio di ATP e la sua idrolisi ad adenosina da parte del CD39 e del CD73 siano cruciali nella funzionalità di queste cellule.

. Chemio-immunoterapia

La chemioterapia e la radioterapia portano a riduzione/regressione del tumore sia in maniera diretta, uccidendo le cellule tumorali, che attraverso dei meccanismi indiretti. In seguito a chemioterapia le cellule tumorali vanno incontro a morte cellulare apoptotica ed esprimono sulla loro superficie o rilasciano nell'ambiente extracellulare molecole che segnalano un danno cellulare e che inducono l'attivazione e la modulazione della risposta immunitaria.(Apetoh, Ghiringhelli et al. 2007; Green, Ferguson et al. 2009).

L'utilizzo di farmaci chemioterapici in associazione ad immunoterapia è stato studiato in lavori sperimentali già nei primi anni '80, ma risultati clinici soddisfacenti sono stati riportati solo di recente. Trials clinici di fase 2 in cui pazienti con melanoma metastatico ricevono una chemioterapia linfodepletante, non-mieloablativa, in associazione al trasferimento adottivo di linfociti infiltranti il tumore (TILs) hanno riportato tassi di risposta generale dei pazienti del 50%-70%. (Dudley, Wunderlich et al. 2005)

Studi condotti in modelli murini hanno dimostrato che la chemioterapia è in grado di aumentare gli effetti anti-tumorali della terapia cellulare adottiva (ACT). Il potenziamento dell'efficacia

dell'immunoterapia avviene tramite diversi meccanismi che includono l'eliminazione di Treg, e l'attivazione di recettori toll-like su cellule presentanti l'antigene in seguito al danneggiamento dell'integrità dell'epitelio intestinale (Gattinoni, Powell et al. 2006). La chemioterapia può anche svolgere un'azione di riduzione delle cellule mieloidi soppressorie. Approcci farmacologici utilizzati in supporto all'immunoterapia anti-tumorale, possono agire a vari livelli sulla biologia delle MDSC negli organi linfoidi secondari, alterando il reclutamento e l'accumulo, la maturazione ed attivazione. L'impiego della gemcitabina, che elimina in modo non selettivo la popolazione CD11b⁺Gr-1⁺, ha portato 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)..

Il reclutamento di MDSC può essere ostacolato anche dall'inibizione di vie di segnalazione intracellulare, come accade con l'inibitore dell'attività tirosin chinasi Sunitinib, che riduce le MDSC in pazienti con carcinoma renale, o con inibitori 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 possibile approccio farmacologico che mira alla eliminazione delle MDSC è stato descritto molto di recente ed è rappresentato dal 5-fluorouracile (5-FU) (Vincent, Mignot et al.).

La fluoropirimidina 5-fluorouracile è un antimetabolita in grado di interferire con i più importanti processi biosintetici e di incorporarsi in macromolecole, come DNA e RNA, inibendo la loro normale funzionalità. Il 5-FU svolge la sua attività citotossica attraverso due principali meccanismi: l'inibizione dell'enzima nucleotide sintetico timidilato sintasi (TS), enzima chiave nell'ambito della riproduzione cellulare in quanto catalizza uno step fondamentale nella sintesi degli acidi nucleici, e la misincorporazione dei fluoronucleotidi nell'RNA.

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- α 25-diidrossivitamina D₃, un metabolita della vitamina D₃, 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 cellule dendritiche mature, con miglioramento della risposta immune anti-tumorale, si ha con l'utilizzo di acido *trans*-retinoico (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 nitroaspirine, 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 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.

MATERIALI E METODI

Topi. Sono stati utilizzati topi C57BL/6 (aplotipo H-2^b), BALB/c (aplotipo H-2^d) di età compresa tra le otto e le dodici settimane, della ditta Charles River Laboratories Inc. Abbiamo acquistato dalla Jackson Laboratories topi OT-1 (C57Bl/6-Tg(TCR α TCR β))1100mjb) con TCR transgenico per il peptide ovalbumina di pollo, OVA₂₅₇₋₂₆₄ di background C57BL/6, topi transgenici esprimenti il gene reporter GFP (C57BL/6-Tg(tet0-CDK5R1/GFP337LhT/J) e topi congenici CD45.1⁺. I topi transgenici pmel-1 di background C57BL/6 con linfociti T CD8⁺ che esprimono il TCR V α 1V β 13 ristretto per H-2D^b per il peptide murino ed umano gp100₂₅₋₃₃ sono stati forniti dal Dott. N. Restifo (Surgery Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD). Topi H-2^b Rag2^{-/-} γ c^{-/-} sono stati acquistati dalla Taconics, mentre i topi H-2^d Rag2^{-/-} γ c^{-/-} sono stati donati dal Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Giappone.

Linee cellulari. Le cellule CT26 sono una linea di colon carcinoma indifferenziato indotto mediante carcinogenesi chimica, derivata da topi BALB/c (aplotipo H-2^d). Le linee: MBL2 di linfoma, MCA203 di fibrosarcoma indotto da 3-metilcolantrene, e EL-4 di timoma transfettata con ovalbumina di pollo (OVA) (EG7) sono tutte derivate da topi C57BL/6 (aplotipo H-2^b). Queste cellule sono state cresciute in DMEM (Invitrogen) addizionato con 2mM di L-glutammina, 10 mM di HEPES, 20 μ M di 2-ME, 150 U/ml di streptomina, 200U/ml di penicillina ed il 10% di siero fetale bovino inattivato dal calore. (FBS, Gibco, CA, USA). Le cellule MSC-1, linea immortalizzata di MDSC, sono state coltivate in RPMI (Euroclone) addizionato con 2mM di L-glutammina, 1mM di Sodio-Piruvato, 150 U/ml di streptomina, 200U/ml di penicillina ed il 10% di siero fetale bovino inattivato dal calore (FBS Superior, BIOCHROM AG).

Citochine e peptide sintetici. Le citochine ricombinanti murine GM-CSF e IL-6 sono state acquistate da Peprotech Inc. I peptidi OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) ristretto per l'aplotipo H-2 K^b, β -gal₉₆₋₁₀₃ (DAPIYTNV) ristretto per l'aplotipo H-2 K^b sono stati tutti sintetizzati dalla JPT (Berlin, Germany). Tutti i peptidi impiegati avevano una purezza superiore al 95% come indicato dall'analisi HPLC. I peptidi liofilizzati sono stati risospesi in DMSO (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,U.S.A.) e stoccati a -80 °C fino al momento dell'uso.

Trattamento chemioterapico. Abbiamo testato l'agente 5-fluorouracile (5-FU) che agisce sull'enzima timidilato sintasi. Per gli esperimenti *in vivo* i topi hanno ricevuto una singola iniezione di 40 mg/kg di 5-FU (Valeant Pharmaceuticals). Il farmaco è stato somministrato per iniezione intraperitoneale.

Trasferimento adottivo (ACT). Il trasferimento adottivo è stato effettuato in topi Rag2-/- γ_c -/- e C57BL/6 dopo inoculazione di 1×10^6 cellule tumorali. Quando il volume del tumore raggiungeva circa i 200 mm³, i topi venivano trattati con 40 mg/ml di 5-FU. Dopo tre giorni 5×10^6 CTL antigene-specifici venivano inoculati i.v. negli animali. Nel momento del trasferimento dei CTL, i topi sono stati inoculati i.m. con 5×10^8 PFU del vettore ricombinante adenovirale codificante per l'antigene riconosciuto dalle cellule T trasferite e poi sono stati inoculati i.p. con interleuchina ricombinante umana IL-2 (30,000 IU) che è stata somministrata due volte al giorno, per 3 giorni consecutivi. Le dimensioni del tumore sono state monitorate ogni due giorni. Gli animali sono stati sacrificati quando il volume del tumore raggiungeva i 1000 mm³.

Separazione cellulare. Linfociti T CD8⁺ sono stati isolati da milze di topi C57BL/6 o transgenici OT-1 attraverso una selezione negativa utilizzando un kit per sorting immunomagnetico (Miltenyi Biotec).. La purezza delle popolazioni cellulari sortate è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica e superava il 90%. Splenociti sono stati marcati con anticorpi PerCP-Cy5.5 anti-CD11b e APC anti-Gr-1 per sortare cellule CD11b⁺Gr-1^{int} e CD11b⁻Gr-1^{int} attraverso un citofluorimetro FACSAriaTM (BD).

Splenectomie. Durante anesestesia, la cavità addominale dei topi è stata aperta ed i vasi splenici sono stati cauterizzati. La milza è stata quindi rimossa e immersa in una soluzione di PBS freddo. Negli animali di controllo l'addome è stato aperto senza effettuare la rimozione della milza.

Culture di midollo osseo. Le tibie ed i femori di topi C57BL/6 sono state rimosse utilizzando tecniche sterili ed il midollo osseo è stato flussato. I globuli rossi sono stati lisati con una soluzione di cloruro di ammonio. Per ottenere MDSC dalle culture di midollo, 2.5×10^6 cellule sono state piastrate in dischi petri del diametro di 100mm (Falcon, Becton Dickinson) in 10 ml di terreno

addizionato con differenti combinazioni di citochine GM-CSF (40 ng/ml) ed IL-6 (40 ng/ml). Le colture così allestite sono state incubate per 4 giorni a 37°C in atmosfera satura di vapore acqueo e contenente il 5% di CO₂.

Colture di cellule mesenchimali staminali (MSC). Topi di otto settimane di età sono stati sacrificati per dislocazione cervicale. Le milze sono state rimosse e incubate in presenza di collagenasi di tipo I (Sigma) per 30 min a 37°C. La sospensione cellulare ottenuta in seguito a disaggregazione meccanica è stata lavata una volta in PBS, le cellule sono state contate e piastrate in dischi petri ad una densità di 4×10^6 /disco in terreno alphaMEM (Invitrogen) 10% FBS (Invitrogen), 1% penicillina/Streptomicina (Invitrogen), 1% L-glutamina (Invitrogen), 10 ng/ml o 1000 Unità/ml LIF (Chemicon /Sigma). La popolazione cellulare non aderente è stata rimossa dopo 72 ore, attraverso due lavaggi con PBS. Le cellule sono state mantenute in coltura per 7-10 giorni.. Ogni 3-5 giorni, quando le cellule raggiungevano una confluenza del 70-80%, venivano staccate con un buffer citrato 1x per 30 min a 37°C.

Co-culture cellulari. Cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} sono state sortate da topi transgenici GFP , mentre le cellule sono state sortate da topi sani e marcate con CMTMR (Molecular Probes, Inc) prima della coltura. La frazione CD11b⁻/Gr-1^{int} è stata incubata in presenza del fluorocromo per 30 min in PBS a 37°C. Dopo un lavaggio con PBS, queste cellule sono state contate e seminate insieme con la popolazione cellulare CD11b⁺/Gr-1^{int} GFP⁺ su di uno strato di cellule mesenchimali, entrambe ad una densità di 5×10^5 cellule/pozzetto. Le co-culture sono state mantenute in terreno per 8 giorni, con dei cambi ogni 96 ore. Dopo 2, 4 e 6 giorni le colture sono state analizzate con un microscopio invertito a fluorescenza per la presenza di clusters sopra lo strato di cellule staminali mesenchimali.

Colture leucocitarie miste. I CTL sono stati stimolati in vitro con due differenti tipi di colture: la coltura leucocitaria mista (MLR) e la coltura mista stimolata con peptide (MLPC). Nelle colture MLR 6×10^5 splenociti provenienti da topi sani o con tumore sono stati incubati con 6×10^5 splenociti BALB/c γ -irradiati. Le MLPC sono state allestite con splenociti coltivati per 5 giorni insieme con l'1% di linfociti T CD8⁺ gp100-specifici, o OVA-specifici derivati da milze di topi transgenici pmel-1 o OT-1. Gli splenociti sono stati pulsati con 1 μ g /ml di hgp100₂₅₋₃₃ o OVA₂₅₇₋₂₆₄ prima di partire con le colture. MSDCs, singeniche verso i linfociti responders, sono state aggiunte

come terza parte alle colture in percentuali scalari che vanno dal 24% al 1,5% della coltura MLPC. Dopo 5 giorni le colture sono state testate per la loro capacità di lisare un target allogeneico (MLR) o un target pulsato con uno specifico antigene (MLPC) mediante un saggio di rilascio di ^{51}Cr (100 μCi , Perkin Elmer). I saggi sono stati allestiti in triplicato ed i surnatanti sono stati raccolti ed analizzati per il rilascio di ^{51}Cr su piastre Lumaplate, cotate con uno scintillatore solido (Perkin Elmer). La percentuale di lisi specifica è stata calcolata utilizzando la seguente formula:
(cpm sperimentali – cpm spontanei)/(cpm massima – cpm spontanei) x 100.

Anticorpi per citofluorimetria. Sono stati utilizzati i seguenti Abs murini: CD11b-PerCPCy5.5, Gr-1-APC, CD124-PE, CD115-PE, CD117-PE, Sca-1-APC, CD44-FITC, CD127-FITC, CD25-FITC, CD45R/B220-PE, CD45-PE, CD45.1-PE, CD62L-FITC, CD11c-FITC, Ly6G-PE, Ly6C-FITC, I-A/I-E-FITC, IFN γ -FITC, CD8a-PE/Cy5, CD29-FITC, CD105-PE;CD34-PE e tutti forniti dalla ditta BD Pharmingen; F4/80-FITC dalla ditta AbD Serotec; CD90-PE, CD45.2-PE e dalla eBioscience; CD4-PECy5, CD3-FITC, CD73-Alexa Fluor 647 dalla ditta Biolegend.

Analisi citofluorimetrica. Le cellule (1×10^6) sono state risospese in 50 μl di FACS buffer (una soluzione contenente 0.9% di NaCl , 2% BSA e 0.02% NaN_3 (Sigma) a cui è stato aggiunto un anticorpo anti-mouse Fc- γ receptor 2.4G2 (clone HB-197, ATCC) per ridurre i siti aspecifici, tale sospensione cellulare è stata quindi incubata per 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono quindi stati lavati e risospesi in 50 μl di FACS buffer per la marcatura con le appropriate quantità di anticorpi. Dopo una incubazione di 20 minuti a 4°C, le cellule sono state lavate, risospese in 200 μl di FACS buffer ed analizzate con il citofluorimetro. Per l'analisi citofluorimetrica della produzione intracellulare della citochina IFN- γ , le cellule sono state incubate per 10 ore con Golgi Stop. Dopo la marcatura di superficie, con gli anticorpi CD45.1-PE e CD8a-PE/Cy5 le cellule sono state lavate con PBS, fissate e permeabilizzate per 20 min a 4 °C (Cytotfix/Cytoperm Kit, BD Pharmingen). In seguito sono stati effettuati dei lavaggi con Perm/ Wash (BD Pharmingen) e le cellule, risospese in Perm Wash, sono state marcate con anti-mouse IFN- γ . Dopo la marcatura ed un lavaggio con PBS le cellule sono state risospese in 200 μl di FACS buffer ed analizzate. L'acquisizione dei dati è stata effettuata con il citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA, U.S.A.) ed analizzati impiegando il programma FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Marcatura con CFSE e saggio di proliferazione. Le colture miste con peptide (MLPC) sono state allestite con splenociti C57BL/6 pulsati con 1 $\mu\text{g/ml}$ di peptide gp100₂₅₋₃₃ umano e sono state coltivate per 5 giorni con l'1% dei linfociti T CD8⁺ gp100-specifici, derivati da milze di topi transgenici pmel-1, marcati con CFSE 1 μM (Molecular Probes). La proliferazione di colture di BM-MDSC è stata misurata attraverso le diluizioni di CFSE a diversi time-points dopo la marcatura delle cellule derivate da midollo osseo con 1 μM di CFSE seguendo lo stesso protocollo usato per le cellule T CD8⁺. Durante il saggio di proliferazione *in vivo* i topi sono stati iniettati i.p. con BrdU (7,2 mg/kg, Sigma) 48 ore prima dell'analisi. Gli animali sono stati sacrificati e sono state isolate le cellule del midollo osseo e gli splenociti; queste cellule sono state marcate con anticorpi anti-CD11b e anti-Gr-1 e successivamente si è effettuata la marcatura BrdU con un kit commerciale (BD Bioscience). Per l'analisi Ki-67, le cellule sono state prime marcate per i marcatori di superficie e, una volta fissate con PBS e paraformaldeide al 2%, sono state marcate con Ki-67-FITC (BD Biosciences) per 30 min, lavate con PBS e analizzate al citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA, U.S.A.).

Test ELISPOT (Enzyme-Linked Immunoassorbent Spot Assay). Il saggio è stato eseguito usando il KIT per la rilevazione di IFN- γ murino (BD Pharmingen, Mountain View, CA, U.S.A.) seguendo le istruzioni allegate, utilizzando le piastre MULTIscreen HTS (Millipore, NJ, U.S.A.). Le cellule isolate dai linfonodi sono state piastrate ad una densità di 5×10^5 cellule/pozzetto e stimulate con il peptide specifico e di controllo (1 $\mu\text{g/ml}$). Il numero di spot è stato valutato in triplicato, con l'utilizzo del lettore automatico di piastre KS e il relativo software.

Preparazioni citologiche. Splenociti appena isolati da milze di topi con tumore trattati e non con 5-FU sono state fatte aderire su dei vetrini mediante Shandon Cytospin ; le cellule risospese in 100 μl di PBS sono state fatte girare per 1 min a 800 rpm, ed in seguito 500 μl di $0,1 \times 10^6$ cellule /ml in PBS sono state girate per 4min a 800 rpm. Le cellule sono poi state fissate in metanolo a -20°C per 20 min. I preparati così ottenuti sono stati marcati per 2 min con un buffer 1:1 May-Grünwald-fosfato (pH 6.8) e per 20 min in 6% Giemsa in buffer fosfato.

Immunofluorescenza. Le milze sono state fissate con PFA 4% in PBS 1X per un'ora a temperatura ambiente; per preservare l'espressione della proteina GFP, le cellule sono state disidratate con 15%

di saccarasio. I tessuti sono stati quindi immediatamente congelati mediante isopentano. Sezioni trasversali (8-10 μm) sono state processate come segue: le fettine sono state fissate per 5 min a temperatura ambiente con PFA 3,7%, i siti aspecifici sono stati bloccati con PBS 10% FBS 0,1% Tween per 30 min a temperatura ambiente. E' seguita l'incubazione delle cellule con l'anticorpo primario rat anti-mouse CD8 (Abcam ab22378 clone YTS169.4), diluito 1:50 per 2 ore a 37°C. L'anticorpo secondario donkey anti-rat RRX, diluito 1:200, in blocking buffer è stato incubato per 1 ora a 37°C. E' stata quindi effettuata un'incubazione con anticorpi primari rat anti-mouse Ly6C-FITC (1:75, BD Pharmingen, clone AL-21), rat anti-mouse CD19-Alexa fluor647 (1:50, eBioscience, clone eBio1D3) a 4°C O/N in blocking buffer. La marcatura dei nuclei cellulari è stata effettuata con DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Invitrogen) in PBS per 10 min a temperatura ambiente. I campioni sono stati infine montati con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) e le immagini sono state acquisite con un microscopio Olympus BX60 (Olympus) e un microscopio confocale Leica LS5 dotato di laser UV, Ar e He.

Misurazione delle variazioni di concentrazione del Ca^{2+} intracellulare. Cellule MSC-1 sono state incubate con fura-2/AM (Molecular Probes, Leiden, Olanda), molecola fluorescente idrofobica e non lipodiffusibile che lega il Ca^{2+} citosolico, producendo un aumento di emissione di fluorescenza, per 20 min a 37°C in soluzione salina contenente 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 5.5 mM glucosio, 5 mM NaHCO_3 , pH 7.4 a cui è stato aggiunto 1 mM CaCl_2 e 250 mM sulfinpyrazone (SP), che è un inibitore dei trasportatori degli anioni organici presenti nella cellula e impedisce l'estrusione dell'indicatore. Le cellule sono state poi lavate e mantenute in salina contenente 1mM CaCl_2 e 250 mM SP fino al momento dell'utilizzo. Le variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in assenza di calcio extracellulare sono state eseguite utilizzando una salina priva di CaCl_2 , e contenente 0.5 mM EGTA. L'intrappolamento del fura è stato verificato con l'aggiunta, al termine dell'esperimento, di 100 nM ionomicina, un Ca^{2+} ionoforo che permette l'ingresso massivo di Ca^{2+} nella cellula. Le misurazioni sono state effettuate utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione a 340-380 nm e di emissione di 500nm.

Misurazione delle variazioni del potenziale di membrana. Cellule MSC-1 vengono risospese in soluzione salina Na^+ , Ca^{2+} in presenza di 200nM del marcatore fluorescente Bisoxonolo. Questo anione lipofilico va incontro ad un aumento di fluorescenza quando lega proteine e fosfolipidi. Le

misurazioni vengono terminate con l'aggiunta di 30mM KCl per ottenere la massima depolarizzazione edell amembrana plasmatica.

Valutazione della permeabilizzazione di membrana. Cellule MSC-1 vengono risospese in soluzione saccaroso- Ca^{2+} in presenza di bromuro d'etidio,.Al fluorimetro vengono registrati cambiamenti di fluorescenza dovuti alla stimolazione con nucleotidi per circa 15 min; in seguito viene aggiunta la digitonina, un detergente che altera l'integrità della membrana cellulare. Cellule MSC-1 sono state incubate in salina Na^+ Ca^{2+} in presenza di Lucifer yellow (1mg/ml), 1mM ATP o 300 μM BzATP e 250mM di SP per 30 min al buio a 37°C. Dopo due lavaggi le cellule sono state analizzate al microscopio a fluorescenza.

Analisi microscopica e videoimaging. Al microscopio ottico invertito Nikon Eclipse TE300 (gruppo Di Virgilio, Ferrara) sono state visualizzate le modificazioni morfologiche delle cellule in seguito alle stimolazioni con i diversi nucleotidi. Le cellule sono state incubate in salina Na^+ , Ca^{2+} in pesenza di 1mM ATP o 300 μM BzATP in un'apposita cameretta termostata. Le immagini sono state acquisite dalla telecamera digitale a precisi intervalli di tempo (10min e 30 min) dal momento dell'aggiunta del nucleotide.

SCOPO DELLA TESI

Le MDSCs rappresentano una popolazione cellulare di grande rilevanza in campo immunologico per la loro capacità di regolare la risposta immunitaria in varie condizioni patologiche, come cancro, malattie infettive acute e croniche, ed autoimmunità.

Questa popolazione cellulare è caratterizzata da un'estrema eterogeneità, in quanto comprende cellule appartenenti a diversi stadi maturativi dello stipite differenziativo mielo-monocitario.

Nel topo queste cellule vengono generalmente identificate mediante i marcatori di superficie CD11b e Gr-1, ma all'interno di questo gruppo cellulare è possibile definire dei sottotipi con diverse caratteristiche fenotipiche e funzionali. Da uno studio effettuato nel nostro laboratorio è stato messo a punto un protocollo di separazione immuno-magnetica che ha permesso di distinguere tre sottopopolazioni mieloidi in base all'espressione differenziale di Gr-1. L'analisi funzionale dei tre sottogruppi ha evidenziato come la popolazione mieloide dotata di una potente attività inibitoria sia una ristretta frazione cellulare (comprendente monociti e precursori mieloidi) caratterizzata fenotipicamente come CD11b⁺Gr-1^{int}.

Il concetto di eterogeneità delle MDSCs non va considerato solo rispetto alla suddivisione interna in diversi sottotipi, in quanto ha una valenza molto più ampia. Recenti evidenze ottenute dal nostro gruppo, in accordo con altri, mostrano come, sebbene in diversa percentuale, le MDSCs siano presenti in vari distretti anatomici negli animali con tumore (milza, tumore, fegato, sangue e midollo) dove esercitano capacità immunosoppressive diverse. Nonostante i risultati raggiunti, molte aspetti del funzionamento di queste cellule devono essere ancora chiaramente delineati.

Pertanto, lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare e meglio definire i meccanismi di induzione della tolleranza messi in atto dalle MDSCs utilizzando due diversi approcci: uno più prettamente molecolare, l'altro basato sulla chemioterapia tumorale.

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno evidenziato che il trattamento *in vivo* con alcuni chemioterapici in animali con tumore determinava un ripristino della risposta immunitaria. Risultati particolarmente apprezzabili sono stati ottenuti con l'utilizzo di un farmaco antimetabolita, il 5-fluorouracile, come adiuvante in associazione all'immunoterapia.

Nella prima parte di questo lavoro, ci siamo avvalsi dell'utilizzo di questo farmaco per andare a studiare i passaggi fondamentali attraverso i quali si attua il programma tollerogenico delle MDSC.

Il secondo approccio che abbiamo usato per meglio capire come sia indotta l'attività soppressoria delle cellule mieloidi, è stato di tipo più puramente molecolare con lo scopo di identificare nuovi candidati coinvolti nel processo tollerogenico. Un numero crescente di studi ha dimostrato che

l'ATP svolge un ruolo molto importante di modulazione della risposta immunitaria, in particolare potenziando e rendendo più efficaci le fasi iniziali della risposta immunitaria innata naturale. Inoltre l'idrolisi di ATP produce l'adenosina che ha un potente effetto anti-infiammatorio. Il gruppo del prof Di Virgilio, ha dimostrato recentemente che la concentrazione dell'ATP nel microambiente tumorale è estremamente elevata rispetto al tessuto sano. Questi dati ci hanno spinto a chiederci se il metabolismo purinergico potesse influire sulla funzionalità delle MDSC e se l'attivazione dei recettori purinergici esercitasse degli effetti sul metabolismo di aminoacidi, tradizionalmente coinvolti nell'induzione di tolleranza da parte delle MDSC.

In sintesi una parte di questo lavoro di tesi è stata dedicata allo studio e alla caratterizzazione delle risposte mediate dai recettori P2, che mediano il rilascio di ATP, sulla linea cellulare mieloide MSC-1. Inoltre, abbiamo verificato la capacità immunosoppressiva di queste cellule in seguito a stimolazione con ATP, cercando di identificare se eventuali modulazioni dell'attività regolatoria fossero mediate da un particolare recettore P2.

RISULTATI

Effetto del farmaco chemioterapico 5-FU sui diversi subsets di MDSC.

I farmaci chemioterapici, attraverso vari meccanismi, colpiscono le cellule tumorali, danneggiandole e portandole a morte. Da evidenze sperimentali è però emerso che questi farmaci possono svolgere la loro attività citotossica sulle cellule cancerose anche interferendo nelle attività di regolazione della risposta immunologica che il tumore induce per poter crescere ed espandersi. Sunitinib e gemcitabina, ad esempio, hanno un effetto di riduzione della popolazione mieloide soppressoria. (Bronte, Chappell et al. 1999; Terabe, Matsui et al. 2003; Suzuki, Kapoor et al. 2005). Alcuni studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che la somministrazione di 5-FU in associazione ad un protocollo di immunoterapia adottiva con linfociti specifici per l'antigene telomerasi di topo (mTERT) permetteva di incrementare in maniera significativa la sopravvivenza di animali con tumore e di rallentare la crescita neoplastica per molte settimane nel caso di terapia combinata ripetuta nel tempo. Questi dati ci hanno spinto a chiederci se anche il 5-FU, come la gemcitabina ed il sunitinib, potesse esercitare un effetto di riduzione delle MDSC, favorendo così il ripristino della risposta immunitaria. Pertanto, in parallelo con un altro gruppo, abbiamo condotto degli esperimenti prima *in vitro* poi *in vivo* in cui le MDSC venivano trattate con 5-FU e abbiamo valutato gli effetti del farmaco in termini di accumulo e di capacità proliferativa delle tre sottopopolazioni mieloidi. Inoltre, abbiamo valutato anche la funzionalità delle MDSC in seguito al trattamento con il 5-FU. I primi esperimenti sono stati condotti *in vitro*. Cellule flussate dal midollo osseo di topi C57BL/6 sono state differenziate *in vitro* con le citochine GM-CSF ed IL-6 (Marigo immunity) e trattate con dosi crescenti di 5-FU per 96 ore; al termine dei quattro giorni di coltura abbiamo analizzato il fenotipo e la capacità immunoregolatoria delle bone-marrow MDSC (BM MDSC). così trattate.

Da questo studio abbiamo potuto determinare che il farmaco altera significativamente la distribuzione relativa delle tre frazioni di cellule mieloidi analizzate, riducendo in particolar modo le cellule caratterizzate dall'espressione intermedia o negativa del marcatore Gr-1 (CD11b⁺/Gr-1^{int} e le CD11b⁺/Gr-1^{lo/neg}). Come si può osservare nei pannelli A e B della figura 1, queste due frazioni diminuiscono all'aumentare della concentrazione del chemioterapico e le cellule che rimangono vitali trascorsi i quattro giorni di coltura in presenza del 5-FU sono per la gran parte costituite da granulociti maturi e monociti (CD11b⁺/Gr-1^{hi}) e non possiedono capacità immunosoppressiva (Fig. 1C).

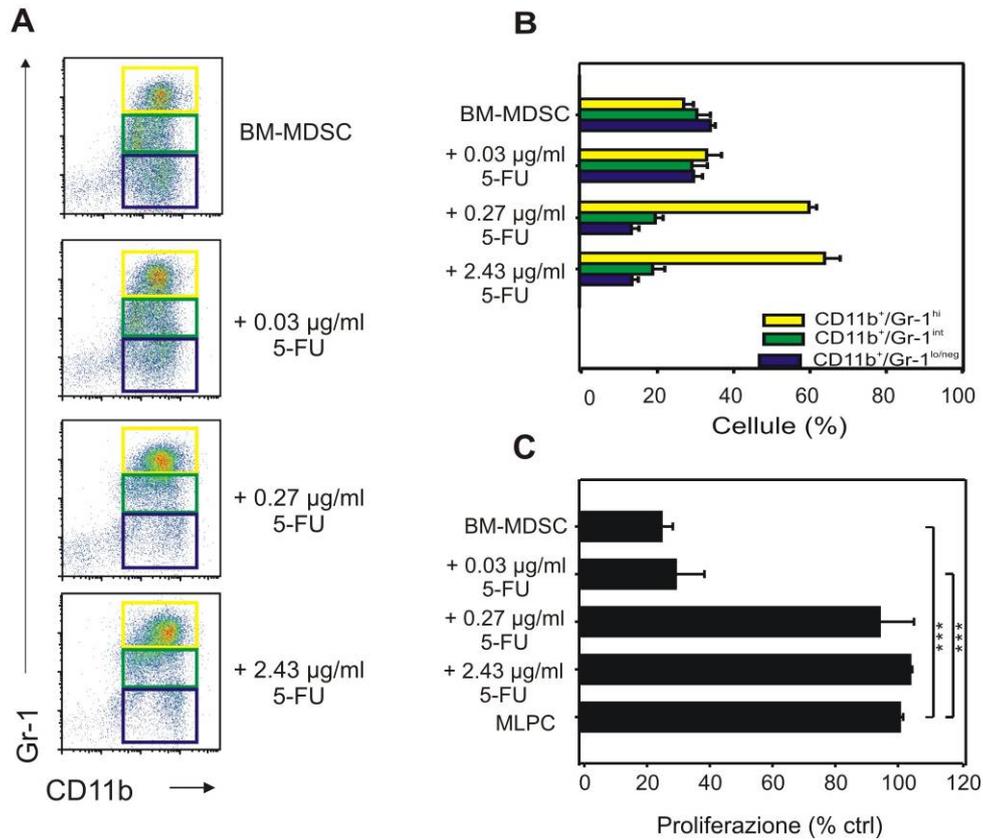


Figura 1. Effetto del trattamento dose-dipendente del 5-FU sui subsets di MDSC .

(A) Distribuzione dei marcatori di superficie CD11b e Gr-1 in colture di cellule di midollo differenziate *in vitro* e trattate con dosi crescenti di 5-FU. I dot plots rappresentano uno di cinque esperimenti indipendenti. (B) Percentuali di accumulo dei subsets mieloidi di colture MDSC ottenute *in vitro* a partire da midollo murino. Il grafico rappresenta la media \pm SD degli accumuli di sottopopolazioni mieloidi di 5 diversi esperimenti. (C) Proliferazione di linfociti T stimolati in presenza di cellule mieloidi ottenute da midollo di topo trattate con dosi crescenti di 5-FU. La percentuale di proliferazione delle colture è stata normalizzata rispetto alla proliferazione media delle colture di controllo in cui i linfociti vengono stimolati con l'antigene in assenza di cellule soppressorie.

Alcuni subsets mieloidi rappresentano un target preferenziale del farmaco 5-FU a causa della loro attività proliferativa.

Abbiamo cercato di capire perché le popolazioni CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁺/Gr-1^{lo/neg} venissero così fortemente colpite dal farmaco. Essendo il 5-FU una molecola antimetabolita, esso viene incorporato più velocemente e danneggia prevalentemente le cellule ad elevato tasso di proliferazione. Per determinare il livello di proliferazione delle diverse popolazioni mieloidi, abbiamo utilizzato anche in questo caso MDSC ottenute differenziando *in vitro* cellule primarie prelevate da midollo osseo. Abbiamo eseguito cinetiche di proliferazione su queste BM MDSC confrontando fra loro le varie frazioni. Questo esperimento ha messo in evidenza che le frazioni CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁺/Gr-1^{lo/neg} proliferano più precocemente ed in modo più sostenuto rispetto agli altri subsets mieloidi.

Per confermare questo dato, abbiamo analizzato le cinetiche di proliferazione delle frazioni mieloidi anche *in vivo*. Pertanto abbiamo eseguito degli studi con il seguente setting sperimentale: topi C57BL/6, inoculati sottocute con la linea tumorale MCA203, sono stati trattati, dopo tre ore dall'inoculo, con una singola dose di 5-FU (40 mg/kg) mediante iniezione intraperitoneale. Gli animali sono stati monitorati per circa trenta giorni, in quanto, in questo arco di tempo, i tumori raggiungevano un volume di 1000 mm³. Trascorsi i trenta giorni, i topi venivano sacrificati. Due giorni prima del sacrificio, agli animali è stata somministrata per iniezione intraperitoneale la 5-bromo-2-deossipurina (BrdU), un analogo sintetico della timidina che si intercala nella doppia elica del DNA, permettendo di distinguere, in base al suo maggior accumulo, le popolazioni a più alto tasso proliferativo. Gli splenociti di questi animali sono stati analizzati al citofluorimetro. Quello che emerge da questo saggio è che, in presenza di tumore, le frazioni CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁺/Gr-1^{lo/neg} di milza incorporano maggiormente BrdU rispetto alle stesse popolazioni in animali sani.

Un saggio simile è stato condotto valutando la porzione gli splenociti positivi per un marcatore del ciclo cellulare, Ki-67. Anche questo saggio conferma che le frazioni più proliferanti sono le CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁺/Gr-1^{lo/neg}.

I dati raccolti indicano che queste due frazioni mieloidi, in seguito al trattamento con 5-FU, subiscono una diminuzione, sia in numero assoluto che percentualmente (come mostrato più avanti), mantenendo però inalterati i loro tassi di proliferazione cellulare.

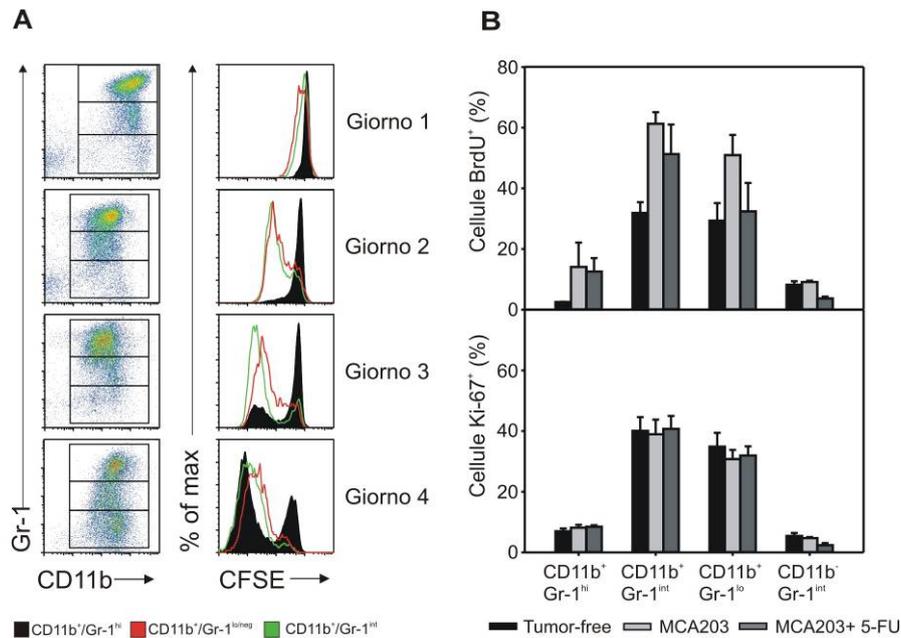


Figura 2. Le frazioni CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁺/Gr-1^{lo/neg} sono particolarmente sensibili all'azione del 5-FU a causa della loro attività proliferativa.

(A) La proliferazione dei subsets mieloidi ottenuti da midollo di topo è stata studiata attraverso l'analisi delle diluizioni del CFSE durante una cultura di quattro giorni. (B) Analisi del potenziale proliferativo di sottopopolazioni di splenociti provenienti da topi sani, topi con tumore non trattati e topi con tumore trattati con 5-FU. La proliferazione è stata misurata *ex vivo* attraverso l'incorporazione di 5-bromo-2-deossiuridina (BrdU) valutato 48 ore dopo la sua somministrazione *in vivo* (pannello in alto), o attraverso la marcatura intracitoplasmatica di Ki-67 (pannello in basso). I dati sono rappresentati come media \pm SD di un esperimento rappresentativo di due effettuati separatamente.

Il 5-FU causa una reciproca modulazione delle frazioni CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁻/Gr-1^{int}

Per confermare i dati sull'effetto di riduzione preferenziale dei sottotipi CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁺/Gr-1^{lo/neg} ottenuti da colture *in vitro* di BM MDSC, abbiamo eseguito gli stessi esperimenti *in vivo*. Abbiamo infatti analizzato le percentuali di accumulo e l'attività funzionale delle sottopopolazioni mieloidi presenti nella milza di topi con tumore, trattati e non trattati con 5FU. Usando lo stesso protocollo sperimentale descritto sopra, topi inoculati con una linea cellulare di fibrosarcoma, MCA203, trattati con una singola dose di farmaco (40 mg/kg) sono stati sacrificati dopo trenta giorni. Gli splenociti estratti dalle loro milze sono stati caratterizzati fenotipicamente per la distribuzione relativa delle tre frazioni e per la loro capacità immunosoppressoria.

In maniera concorde ai dati ottenuti *in vitro*, la somministrazione *in vivo* del farmaco causava una riduzione significativa delle frazioni CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁺/Gr-1^{lo/neg} rispetto ai topi non trattati (Fig 3A-3B). Gli stessi esperimenti sono stati eseguiti, in parallelo, in topi Rag2^{-/-}γc^{-/-}, che sono privi della componente cellulare linfoide, ma mantengono quella mieloidi. Questi esperimenti sono stati allestiti per testare l'azione del farmaco in modelli animali in cui il comparto mieloidi fosse libero da possibili interferenze prodotte da altre popolazioni leucocitarie. In questi topi il trattamento con 5-FU non produce alcun cambiamento nel numero delle cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁺/Gr-1^{lo/neg} rispetto ai topi non trattati; infatti, le popolazioni si mantengono numericamente molto alte in entrambi i casi.

Inoltre, come si può osservare nella figura 3A, la frazione CD11b⁺/Gr-1^{int}, che si espande maggiormente rispetto alle altre frazioni mieloidi in presenza del tumore, subisce una forte riduzione con il trattamento chemioterapeutico (riquadro in verde). Lo stesso andamento di espansione/riduzione è presente, in senso inverso, nella popolazione CD11b⁻/Gr-1^{int}. Questa frazione, infatti, contrariamente a quanto si verifica per le cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} è bene evidente in topi sani, si riduce in presenza del tumore per poi espandersi di nuovo con la somministrazione del farmaco (riquadro in rosso).

Gli splenociti derivati da topi con tumore trattati e non trattati con il 5-FU sono stati testati anche per la loro capacità immunosoppressoria sia in colture miste stimolate con antigeni allogeneici (MLR) (Fig. 3C) che in colture miste stimolate con peptide (MLPC) (Fig.3D). Dall'analisi del saggio per il rilascio di ⁵¹Cr si è ottenuto che le MDSC derivate da topi trattati con il chemioterapico mostrano una ridotta funzionalità rispetto alle MDSC derivate da topi non trattati. Il trattamento chemioterapico, dunque, produce un effetto durevole di correzione dell'attività immunoregolatoria, bloccando gli effetti soppressori esercitati dalle cellule mieloidi per almeno quattro settimane dalla sua unica somministrazione (Fig. 3C-3D), mentre non è in grado di esercitare alcuna azione sulla cinetica di crescita del tumore (Fig. 3E).

Allo scopo di testare la durata dell'effetto citotossico del 5-FU sulle tre frazioni mieloidi abbiamo condotto una cinetica di ripopolamento delle sottopopolazioni. In esperimenti allestiti con lo stesso protocollo sperimentale descritto sopra, splenociti di topi trattati con il 5-FU o con il veicolo di controllo nel quale viene preparato il farmaco sono stati prelevati e analizzati per l'espressione dei marcatori CD11b e Gr-1 ad intervalli di tempo di 5 giorni. Con l'analisi della presenza in termini numerici assoluti delle 3 frazioni nei trenta giorni che seguono la somministrazione del farmaco è stata costruita una curva di ripopolamento delle sottopopolazioni.

Da questi esperimenti emerge che entrambe le popolazioni $CD11b^+/Gr-1^{hi}$ e $CD11b^+/Gr-1^{int}$ sono inizialmente influenzate dal trattamento con il 5-FU, ma la frazione $CD11b^+/Gr-1^{hi}$ si ricostituisce in circa 25 giorni dalla somministrazione del farmaco, mentre la frazione $CD11b^+/Gr-1^{int}$ rimane ancora fortemente ridotta.

Nel loro complesso questi risultati ci hanno spinto a pensare che le due popolazioni cellulari $CD11b^+/Gr-1^{int}$ e $CD11b^-/Gr-1^{int}$ siano in una sorta di equilibrio tra di loro, ed in stretto contatto le une con le altre, al punto di ipotizzare che colpendone una si crei un vantaggio per l'espansione dell'altra.

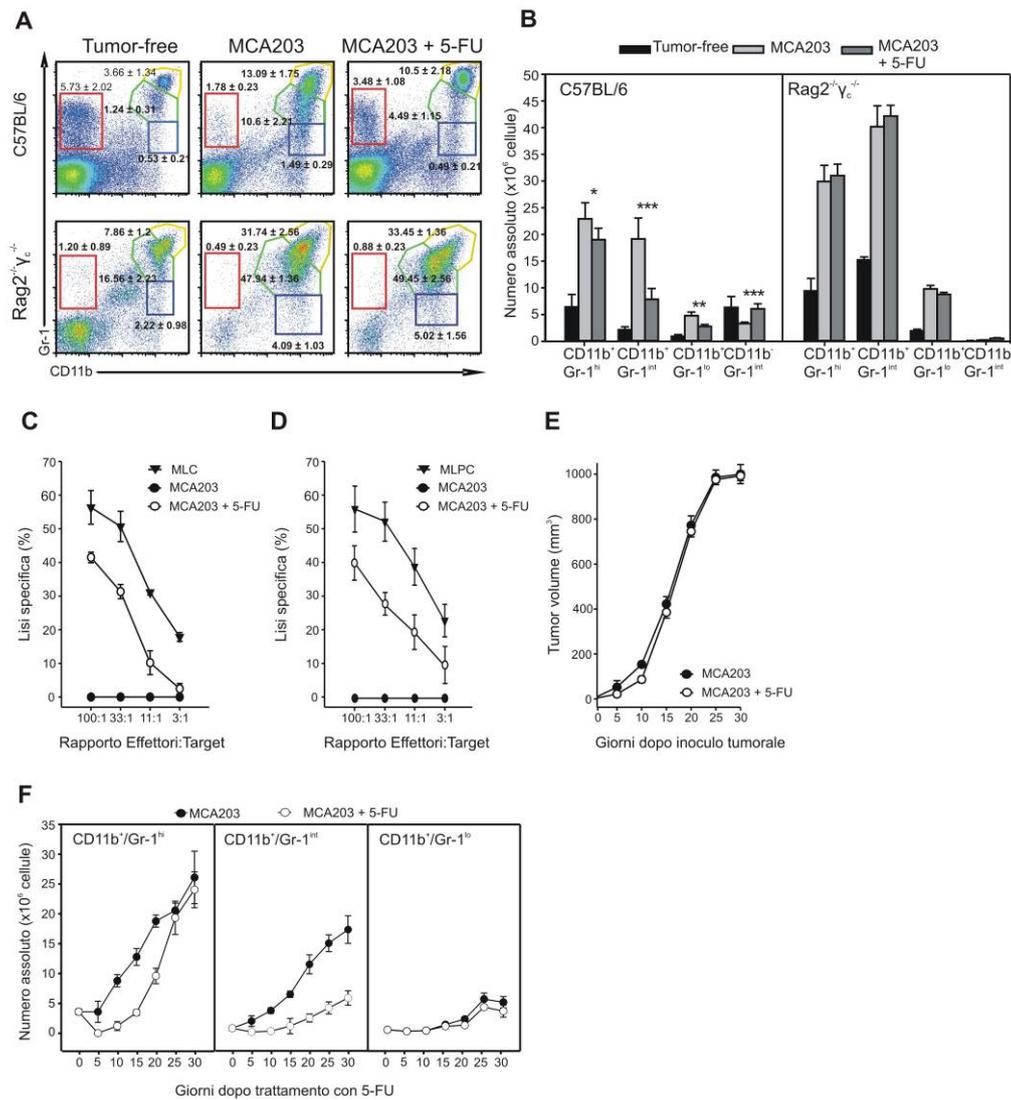


Figura 3. Reciproca regolazione delle popolazioni CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁻/Gr-1^{int} presenti nella milza .

(A) Topi C57BL/6 e Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} inoculati con un milione di cellule MCA203 sono stati trattati dopo circa tre ore con il farmaco 5-FU in singola dose. Gli splenociti estratti dagli animali sacrificati dopo trenta giorni sono stati analizzati per l'espressione dei marcatori CD11b e Gr-1. (B) I numeri assoluti dei differenti subsets cellulari sono riportati come valori medi ± SD (n=3). Il test di Wilcoxon è stato usato per comparare i gruppi MCA203 vs MCA203 + 5-FU: * p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001. (C e D) Valutazione della risposta immunitaria in animali con tumore MCA203 trattati e non con 5-FU; gli splenociti sono stati usati per allestire colture allogene (MLCs) o stimolate con peptide (MLPCs) e sono state testate per la loro attività citotossica con il saggio di rilascio di ⁵¹Cr. (E) Curva di crescita tumorale di topi inoculati con tumore MCA203 trattati o meno con il farmaco 5-FU. (F) Cinetica di proliferazione cellulare tra le popolazioni CD11b⁺/Gr-1^{hi}, CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁺/Gr-1^{lo/-} dopo trattamento con 5-FU. Gli animali sono stati sacrificati in tempi diversi dopo la somministrazione del chemioterapico. I dati sono rappresentati come valori medi ± SD (n=3) per ogni tempo analizzato. Il test t Student è stato usato per paragonare i gruppi MCA203 vs MCA203 + 5-FU: *** p≤0.001.

Caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁻/Gr-1^{int}

Con gli esperimenti fin qui condotti abbiamo ampiamente dimostrato che il farmaco antimetabolita, 5-FU, produce un effetto citotossico sulle MDSC, che si manifesta con una significativa e prevalente riduzione nell'accumulo della frazione CD11b⁺/Gr-1^{int} e nella perdita della funzione immunoregolatoria. Inoltre, sorprendentemente, il trattamento *in vivo* con questo farmaco ha evidenziato una reciproca modulazione delle sottopopolazioni spleniche CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁻/Gr-1^{int}. Come passo successivo abbiamo quindi caratterizzato fenotipicamente e dal punto di vista funzionale queste due popolazioni.

La frazione CD11b⁺/Gr-1^{int} è costituita da cellule immature omogeneamente positive per i marcatori F4/80 e CD124/IL-4 R α , come già riportato dal nostro gruppo (Dolcetti, Peranzoni et al.; Marigo, Bosio et al.). Inoltre, esse esprimono a vari livelli, a seconda del tipo di tumore, il recettore C-kit (CD117) ed il recettore del fattore di stimolazione delle colonie di monociti/macrofagi (M-CSF o CD115). Le cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} sopprimono, in maniera dose-dipendente, l'attività citotossica di linfociti T CD8⁺ stimolati da una coltura allogenica. Queste cellule presentano il caratteristico nucleo "a ciambella", tipico delle cellule ad uno stadio immaturo di differenziazione (Fig. 4A).

La frazione CD11b⁻/Gr-1^{int} è invece costituita da piccoli linfociti T CD8⁺ che esprimono marcatori caratteristici delle cellule T della memoria centrale (T_{CM}) come CD62L⁺/CD44⁺/CD127⁺/CD25⁻ e che sono in grado di montare una forte risposta citotossica verso alloantigeni (Fig. 4B). Il nucleo di queste cellule grande e rotondeggiante le occupa quasi completamente. Entrambe le frazioni risultano positive per l'anticorpo anti-Gr-1; questa positività dipende quasi interamente dalla loro comune e forte espressione della molecola Ly6C (Fig 4A e B).

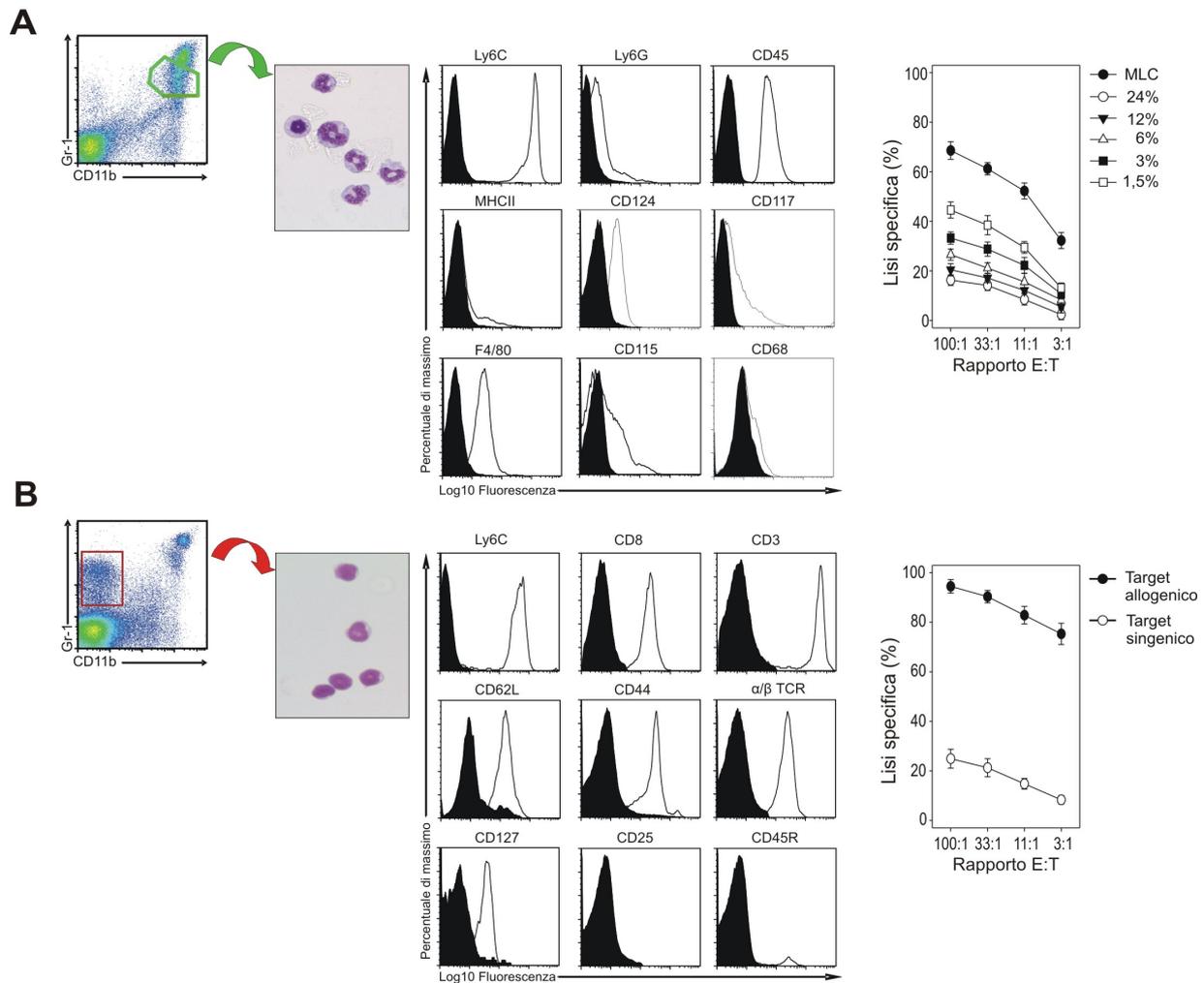


Figura 4. Caratterizzazione fenotipica e funzionale delle sottopopolazioni CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁻/Gr-1^{int}.

(A) Le cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} (riquadro in verde) sono state sortate al FACS dopo essere state marcate con gli anticorpi anti-CD11b e anti-Gr-1. Le cellule sono state analizzate per la loro morfologia attraverso la tradizionale colorazione con May-Grünwald-Giemsa (pannello a sinistra), per il loro fenotipo attraverso il citofluorimetro (pannello centrale) e per la loro funzionalità (pannello a destra). L'attività soppressoria esercitata *in vitro* da queste cellule è stata valutata aggiungendone in diverse percentuali ad una coltura MLPC allestita con linfociti T CD8⁺ specifici per l'ovalbumina di pollo, ottenuti da topi transgenici OT-1, stimolati *in vitro* in presenza del peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄. Dopo cinque giorni l'attività citotossica dei linfociti è stata testata mediante il saggio del rilascio di ⁵¹Cr. (B) Le cellule CD11b⁻/Gr-1^{int} (riquadro in rosso) sono state sortate mediante FACS in seguito alla marcatura con gli anticorpi anti-CD11b e anti-Gr-1. Come per l'altra frazione cellulare anche i linfociti T_{CM} sono stati analizzati per la loro morfologia (pannello a sinistra), fenotipo (pannello centrale) ed attività citotossica (pannello a destra). Per testare la loro citotossicità, le cellule CD11b⁻/Gr-1^{int} sono state coltivate in presenza di linfociti allogeici γ -irradiati per cinque giorni e poi testate in un saggio di rilascio di ⁵¹Cr contro cellule target allogeiche e singeniche.

Saggio *in vitro* di “cobblestone area-forming cell”

La capacità delle CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁻/Gr-1^{int} di modularsi reciprocamente, ci ha portato ad ipotizzare che queste popolazioni cellulari potessero trovarsi a stretto contatto tra di loro.

Per cercare di determinare se le cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁻/Gr-1^{int} potessero condividere un microambiente comune, abbiamo allestito dei saggi di “cobblestone area-forming cell” (Ueda, Kondo et al. 2005). Attraverso l’allestimento di co-culture *in vitro* abbiamo testato la capacità delle cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD8⁺ T_{CM} di interagire e crescere vicine formando dei “cobblestone”.. Cellule CD8⁺ T_{CM}, sortate da splenociti di topi sani, marcate con il fluorocromo rosso CMTMR, sono state piastrate in egual numero con cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} sortate da milze di topi GFP con tumore. Seguendo il protocollo di questo saggio, le due frazioni cellulari sortate sono state piastrate su di uno strato di cellule mesenchimali (MSC) di origine splenica che funge da struttura fibrosa, permettendo alle cellule si attaccarsi e proliferare (Fig. 5A-B). Le MSC, ottenute da milze di topi sani, sono state coltivate in terreno selettivo, in presenza di Leukemia Inhibitory Factor (LIF), per diversi passaggi, fino ad ottenere una popolazione staminale omogenea. Il fenotipo delle MSC usate in questi studi è mostrato nella Figura 5C. Nell’arco di circa una settimana abbiamo potuto osservare la formazione di clusters di cellule rosse e verdi, anche se la tendenza ad aggregarsi sembra essere più marcata per le MDSCs. La formazione dei clusters è completamente dipendente dalla presenza del feeder di cellule mesenchimali, senza le quali le due popolazioni cellulari muoiono nel giro di 48 ore.

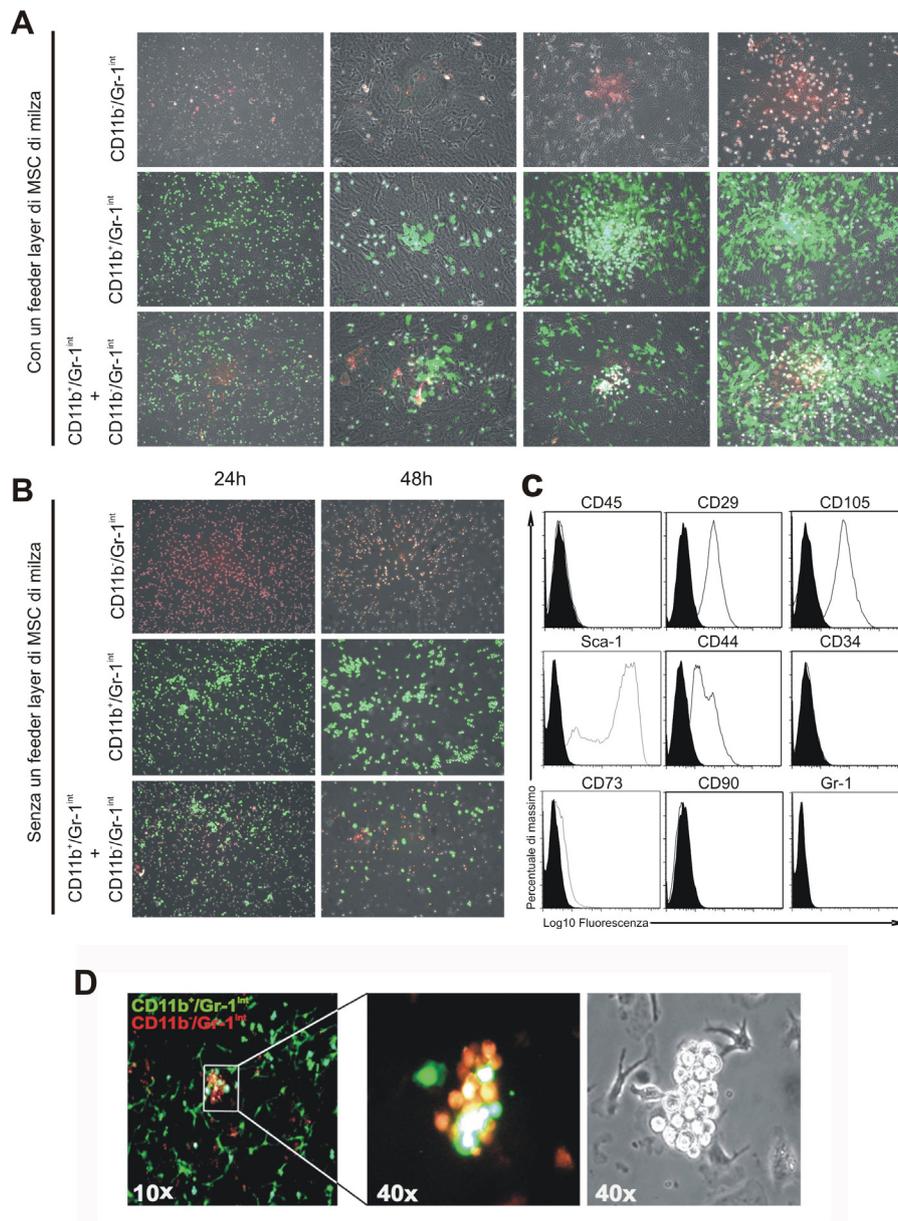


Figura 5. Cinetica di una co-cultura *in vitro* di cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁻/Gr-1^{int}.

(A) Cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} (5×10^5 GFP/ verdi) e CD11b⁻/Gr-1^{int} (5×10^5 colorate con CMTMR/ rosse), precedentemente sortate per la purezza, sono state co-cultivate o coltivate separatamente su un "feeder layer" di cellule mesenchimali spleniche ($15,000$ cellule/cm²) e sono state analizzate al microscopio a fluorescenza. Otto giorni dopo, le cellule CD11b⁻/Gr-1^{int} coltivate singolarmente erano disperse e distribuite uniformemente nei pozzetti. Le cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} erano raggruppate insieme. Le cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} e CD11b⁻/Gr-1^{int} co-cultivate avevano formato dei "cobblestone cluster". (B) Cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} (5×10^5 GFP/ verdi) e CD11b⁻/Gr-1^{int} (5×10^5 colorate con CMTMR/ rosse), sortate, sono state co-cultivate o coltivate separatamente senza un feeder layer di cellule mesenchimali spleniche ($15,000$ cellule/cm²) e sono state analizzate al microscopio a fluorescenza. (C) Caratterizzazione fenotipica di cellule mesenchimali di origine splenica. (D) Particolare di un cluster di cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} (verdi) e CD11b⁻/Gr-1^{int} (rosse) dopo otto giorni di coltura; l'immagine a fluorescenza e quella di microscopia ottica mostrano lo stesso cluster.

MDSC e CD8⁺ T_{CM} condividono una nicchia di sviluppo comune nella milza

Dopo i risultati ottenuti dalle co-culture *in vitro*, abbiamo valutato se MDSC e CD8⁺ T_{CM} occupano la stessa nicchia biologica *in vivo*. Pertanto, la popolazione CD11b⁺/Gr-1^{int}, sortata da topi transgenici per GFP, e la frazione CD11b⁻/Gr-1^{int}, sortata e marcata con CMTMR sono state inoculate in topi Rag2^{-/-}γ_c^{-/-}. Per creare un ambiente neutrale in cui nessuna delle frazioni trasferite potesse essere condizionata dalle popolazioni presenti negli animali “recipiente”, topi Rag2^{-/-}γ_c^{-/-}, che mancano della componente linfoide, sono stati trattati con 5-FU per depletare anche la componente mieloide. Dopo sette giorni, i topi sono stati sacrificati e le milze analizzate mediante colorazione con ematossilina/eosina e per la presenza di clusters di cellule rosse e verdi al microscopio confocale. Le milze dei topi Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} trattate con il farmaco presentano un'architettura fortemente danneggiata rispetto a topi wild type sani; le cellule rosse e verdi tendono comunque ad unirsi strettamente in aggregati pseudo-follicolari (Fig. 6A).

Abbiamo quindi valutato se, dopo trasferimento adottivo, le due popolazioni potessero espandersi in maniera divergente in situazioni stazionarie (topi immunodeficienti privi di tumore), in una situazione favorente l'espansione delle MDSC (topi immunodeficienti con tumore) o in situazione di attivazione preferenziale delle cellule CD8⁺ (topi immunodeficienti allogeneici). Mentre nello stato stazionario il rapporto tra le due popolazioni cellulari è di 1:1, questo rapporto viene modificato in favore della componente mieloide nel caso di ospiti con tumore e in favore della componente cellulare T nel caso di animali che vanno incontro ad una reazione di rigetto verso l'ospite. In questo ultimo caso, l'espansione delle cellule T CD8⁺ aveva portato ad una quasi completa scomparsa delle cellule mieloidi dall'area occupata dai linfociti T CD8⁺. Questi esperimenti di trasferimento confermano la reciproca occupazione dei linfociti T_{CM} e delle cellule mieloidi della nicchia splenica anche in ospiti immunocompromessi ed indicano che la nicchia non richiede la presenza di altre popolazioni linfoidi, assenti nei topi immunodeficienti utilizzati negli studi.

Inoltre, allo scopo di valutare l'effetto del trattamento chemioterapico sulla distribuzione delle cellule mieloidi nella milza, abbiamo analizzato la localizzazione delle cellule Ly6C⁺ nelle milze di topi sani, topi con tumore non trattati e trattati con 5-FU. Abbiamo preparato delle sezioni di 8 μm di spessore delle milze degli animali nelle tre diverse condizioni sperimentali e seguendo un protocollo di immunofluorescenza abbiamo marcato i tessuti con anticorpi anti-Ly6C, anti-CD8 e anti-CD19. In questo modo abbiamo valutato la localizzazione delle cellule mieloidi rispetto ai linfociti T e B. Le cellule Ly6C⁺ si posizionano sia nell'area vicina alla capsula, il tessuto connettivale che circonda la milza (Fig. 7A-7C-7E), che in zone centrali della milza (Fig. 7B-7D-7F), in particolare si distribuiscono lungo la zona marginale (MZ), l'area che separa la polpa bianca

dalla polpa rossa. Le cellule B si localizzano nei follicoli linfoidi, dispersi in tutto l'organo, mentre le cellule T si posizionano attorno ai manicotti periarteriolari linfoidi (PALS). Da queste immagini emerge chiaramente che la popolazione mieloidi si espande massivamente in presenza di tumore a danno dei PALS, mentre viene fortemente ridotta dal trattamento con 5-FU.

Infine, sono state effettuate delle immunofluorescenze per valutare la localizzazione di cellule Ly6C⁺ (MDSC), cellule CD8⁺ (T naïve) e cellule CD8⁺Ly6C⁺ (T_{CM}) nella milza di topi con tumore. Le cellule T naïve si trovano per la maggior parte disperse nella polpa rossa, lontane dalle cellule mieloidi (Fig. 8A). Al contrario, lungo la zona marginale, dove si concentrano le cellule mieloidi sono evidenti cellule CD8⁺ T_{CM} strettamente connesse ad esse, a formare dei clusters (Fig. 8B). Cellule polimorfonucleate (Ly6G⁺) non presentano coespressione di CD8.

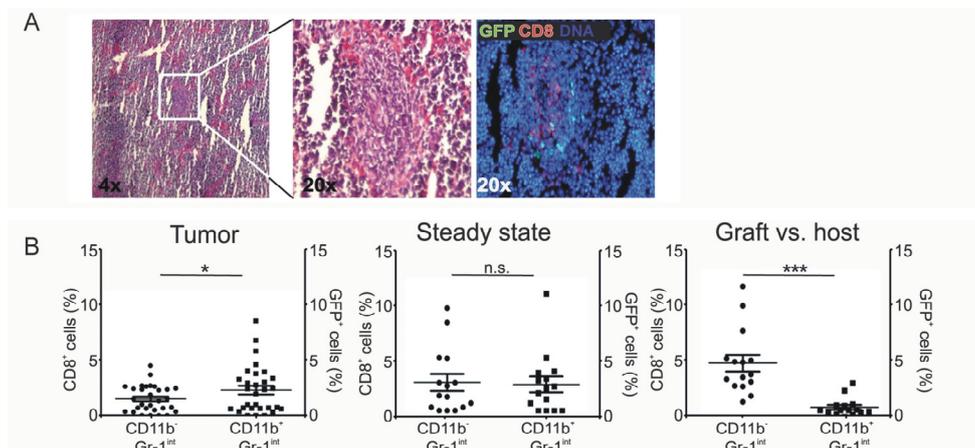


Figura 6. MDSCs e CD8⁺ T_{CM} condividono una stessa nicchia nella milza.

(A) Le cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} (GFP/verdi) e CD11b⁻/Gr-1^{int} (CMTMR/rosse) sono state iniettate in topi Rag2^{-/-}γc^{-/-} privi di tumore, trattati, due giorni prima, con una singola iniezione di 5-FU. Dopo sette giorni le milze degli animali sacrificati sono state prelevate e analizzate mediante la colorazione con ematossilina/eosina e microscopia confocale. L'architettura delle milze dei topi Rag2^{-/-}γc^{-/-} risultava fortemente alterata rispetto alla milza normale a causa sia della mancanza dei linfociti B e T che per il pre-trattamento con il chemioterapico. (B) Le cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} (GFP/verdi) e CD11b⁻/Gr-1^{int} (CMTMR/rosse) sortate da topi C57BL/6 sono state inoculate i.v. (10⁶ /topo) in topi C57BL/6 Rag2^{-/-}γc^{-/-}, pre-condizionati, due giorni prima, con una singola dose di 5-FU. Le due frazioni cellulari sono state contate in ospiti in diverse condizioni: con tumore (MCA203, impiantato 7 giorni prima), in stato stazionario (senza tumore) ed in caso di rigetto verso l'ospite (cellule T CD8⁺ da topi C57BL/6 sono stati trasferiti in recipienti BALB/c Rag2^{-/-}γc^{-/-}). Le cellule sono state contate come numero di GFP⁺ e/o di cellule CD8⁺ sul totale dei nuclei. Test t student. Tumore: cellule GFP⁺ vs cellule CD8⁺ *p≤0.05; Stato stazionario: n.s.; Rigetto vs ospite: cellule CD8⁺ vs cellule GFP⁺ ***p≤0.001.

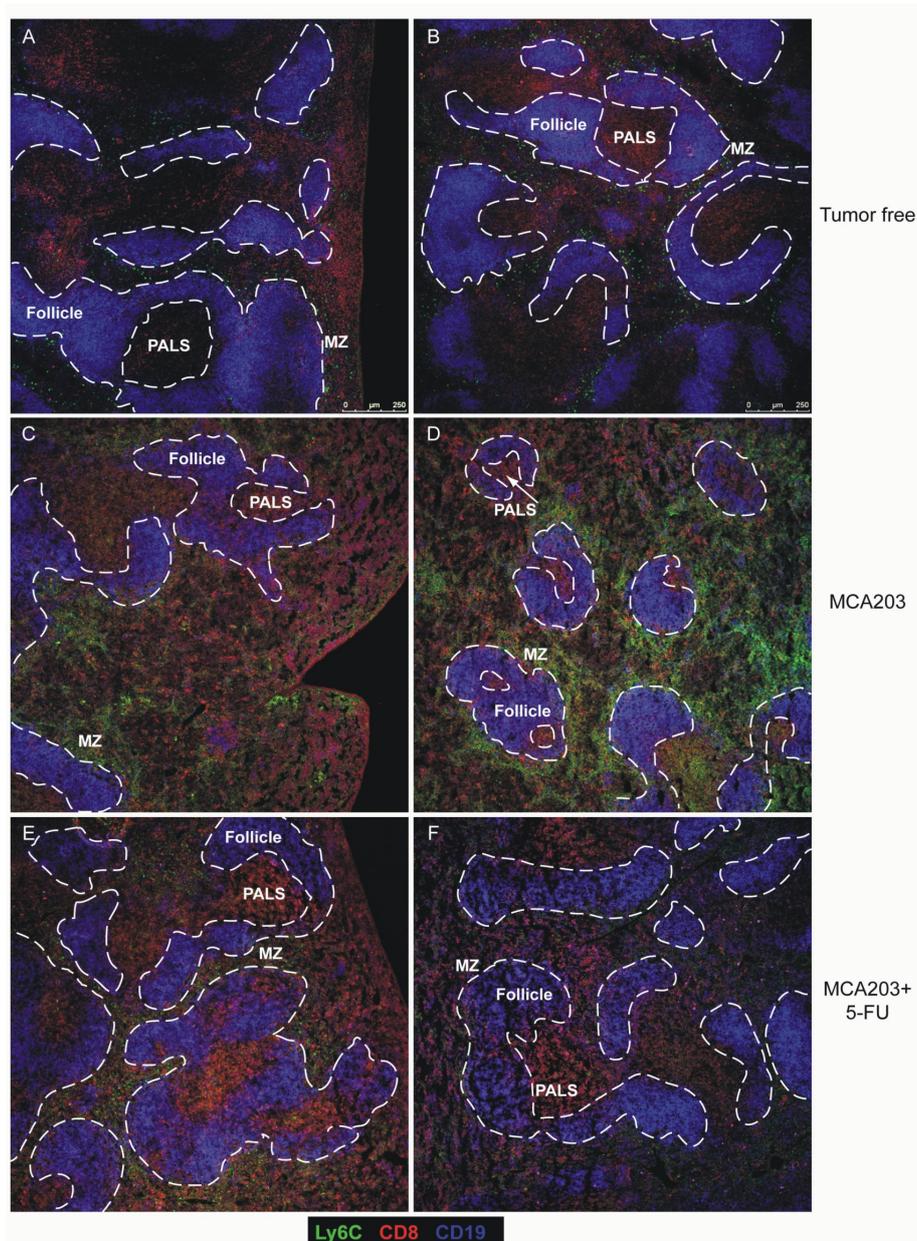


Figura 7. Localizzazione delle cellule Ly6C⁺ nella milza di topi liberi da tumore, con tumore non trattati e con tumore trattati con 5-FU.

Sezioni sottili sono state marcate con gli anticorpi indicati ed analizzati al microscopio confocale. Le milze provengono sia da animali senza tumore che da animali con un fibrosarcoma sottocutaneo di circa 600 mm³ di volume, trattati o meno per tre settimane con il farmaco 5-FU. Nei pannelli (A), (C) ed (E) viene mostrata l'area delle sezione vicina alla capsula, il tessuto connettivale fibroelastico che circonda la milza dal quale dipartono i setti che la suddividono in diverse concamerazioni. I pannelli (B), (D) e (F) mostrano zone della sezione vicine alla parte più interna della milza. Le cellule B sono localizzate nei follicoli linfoidi, dispersi in tutto l'organo, le cellule T sono localizzate attorno alle arterie centrali a formare aggregati detti, manicotti periarteriolari linfoidi (Periarteriolar Lymphoid Sheath, PALS). La polpa bianca è delimitata dalla zona marginale (MZ), che la separa dalla polpa rossa. Le cellule Ly6C⁺ si localizzano lungo la MZ. Nei topi con tumore, la MZ si presenta iperplastica a danno dei PALS e questo aspetto viene revertito dal trattamento con 5-FU. Le immagini sono state acquisite con un obiettivo 20X.

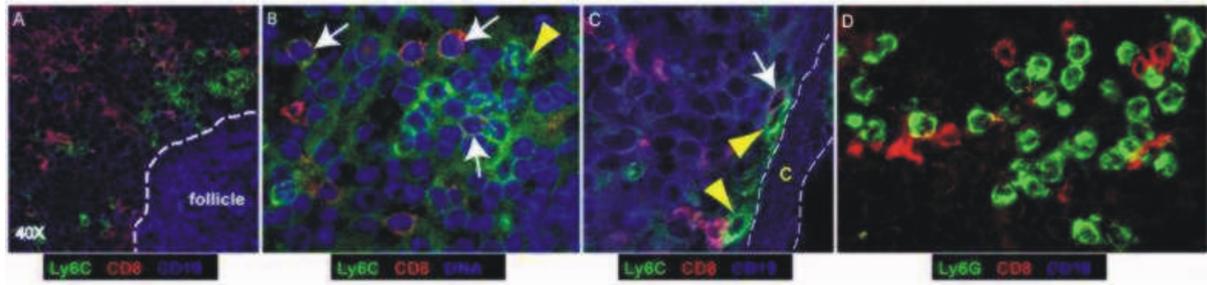


Figura 8. Localizzazione dei clusters di linfociti CD8⁺ T_{CM} e MDSCs nella milza di topi con tumore.

(A) Nella milza di topi con tumore i linfociti T singolarmente positivi per CD8⁺ (per la maggior parte cellule T naïve) si trovano confinati nelle aree in cui mancano cellule Ly6C⁺. (B) Al contrario la MZ contiene cellule Ly6C⁺ singole positive (MDSC) che formano dei clusters con cellule doppie positive per CD8 e Ly6C⁺ (CD8⁺ T_{CM}), le quali a volte vengono a trovarsi letteralmente annidate al loro interno. (C) Cellule singole e doppie positive possono essere individuate subito sotto la capsula della milza in topi con tumore. (D) La marcatura per Ly6G evidenzia cellule polimorfonucleate disperse ovunque all'intero organo (per la maggior parte nella polpa rossa). In questo caso nessuna cellula doppia positiva (Ly6G⁺/CD8⁺) e nessun cluster è stato osservato.

La milza, in animali con tumore, è l'organo centrale per l'induzione della tolleranza.

Sulla base dei risultati ottenuti ci siamo chiesti quale ruolo avesse la nicchia biologica da noi descritta nell'attivazione della funzione inibitoria della risposta immunitaria nella milza e se la sua eliminazione mediante asportazione della milza potesse revertire la tolleranza immunologica. Abbiamo pertanto allestito degli esperimenti in cui topi C57BL/6 sono stati sottoposti a splenectomia o a "sham-surgery". In seguito all'asportazione della milza abbiamo atteso che gli animali superassero completamente l'operazione. Dopo 14 giorni agli animali operati è stato impiantato un tumore esprimente l'antigene ovalbumina (OVA). I tumori sono stati fatti crescere per sette giorni, senza che venissero riscontrate delle differenze nelle curve di crescita tra i gruppi di animali splenectomizzati e quelli sottoposti a "sham-surgery". Successivamente abbiamo effettuato in questi animali un trasferimento adottivo di linfociti T CD8⁺ con recettori per le cellule T (TCR) specifici per OVA, tracciabili *in vivo* attraverso il marcatore congenico CD45.1. Dagli animali sacrificati sono stati estratti ed analizzati i linfonodi drenanti il tumore per valutare il numero dei linfociti T citotossici (CTL) OVA-specifici presenti e la loro capacità responsiva verso l'antigene tumorale. Per far questo sono stati condotti saggi ELISPOT e marcature intracitoplasmatiche. Da questi esperimenti è emerso che mentre i topi con tumore e quelli sottoposti a "sham-surgery" presentavano dei linfociti T CD8⁺ non responsivi (Fig. 9A), negli animali splenectomizzati, con e senza tumore, erano presenti dei CTL numericamente abbondanti e funzionali. Questi dati dimostravano che la tolleranza indotta dal tumore non aveva avuto luogo ed il numero dei linfociti T CD8⁺ funzionalmente attivi presenti nei linfonodi drenanti il tumore era simile a quello che si riscontra in animali sani.

La splenectomia abrogava la tolleranza indotta dal tumore anche in topi che avevano ricevuto linfociti OT-1 stimolati *in vitro* con il peptide OVA prima del trasferimento adottivo, in modo da generare cellule effettrici e di memoria (Fig. 9B). Questi risultati suggeriscono è nella milza di animali con tumore che cellule T CD8⁺ specifiche per un antigene tumorale, che siano naïve o attivate, vanno incontro ad una tappa fondamentale per l'induzione della tolleranza .

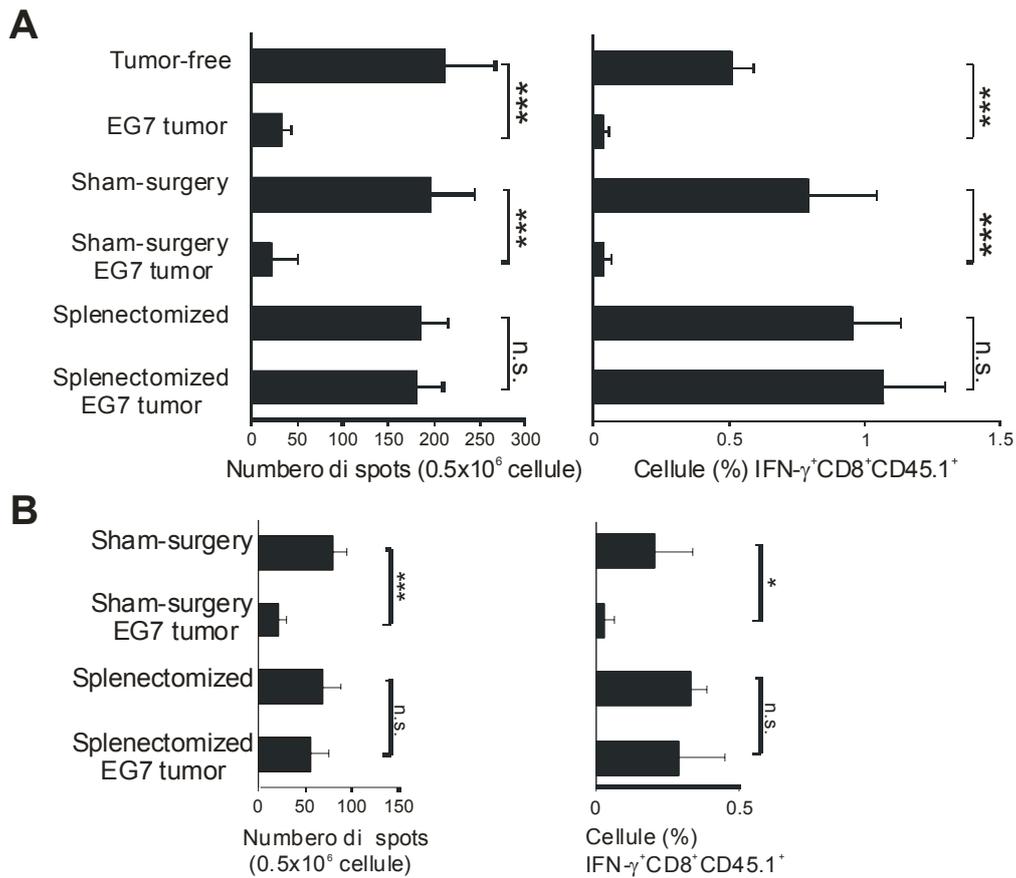


Figura 9. La milza è l'organo centrale per l'induzione della tolleranza nel tumore.

(A) Topi C57BL/6 sono stati splenectomizzati o sottoposti a sham-surgery. Dopo 14 giorni i topi sono stati iniettati o meno con 10^6 cellule di timoma EG7. Dopo 7 giorni i topi hanno ricevuto, per iniezione endovenosa, 5×10^6 cellule T $CD8^+$ isolate dalla milza di animali OT-1. Trascorsa una settimana, i topi sono stati sacrificati e le cellule estratte dai linfonodi drenanti il tumore sono state testate per la produzione di $IFN-\gamma$ mediante saggio ELISPOT (pannello di sinistra) e per marcatura intracitoplasmatica (pannello di destra). I dati della marcatura sono presentati come media \pm SD della percentuale di cellule $CD8^+ CD45.1^+ IFN-\gamma$ -producenti. (B) In questo esperimento invece di trasferire cellule T $CD8^+$ naïve, sono stati trasferiti 5×10^6 cellule T $CD8^+$ attivate mediante stimolazione antigenica. Test *t* Student: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Analisi delle risposte della linea cellulare MSC-1 in seguito a stimolazione con nucleotidi purinici e pirimidinici.

In collaborazione con il gruppo del Prof. Di Virgilio di Ferrara, siamo andati a studiare l'attività dei recettori purinergici espressi dalla linea cellulare mieloide MSC-1 in risposta a stimolazione con diversi nucleotidi e analoghi di nucleotidi. Le cellule MSC-1 sono state immortalizzate da MDSC fresche e presentano una buona somiglianza fenotipica e funzionale con le cellule di origine (Apolloni, Bronte et al. 2000). Per iniziare sono stati condotti degli esperimenti al fluorimetro di analisi della risposta del calcio intracitoplasmatico in seguito a stimolazione con ATP. La stimolazione con il nucleotide attiva i recettori purinergici delle cellule mieloidi (tra cui P2X₇), producendo un aumento della concentrazione citosolica del calcio che si mantiene elevata per un periodo prolungato. La figura 10A mostra l'aumento del Ca²⁺ in MSC-1 stimulate con 1 mM ATP in presenza o assenza di calcio extracellulare. La stimolazione con ATP nel mezzo privo di Ca²⁺ avviene in presenza di 0.5 mM di EGTA, un chelante che lega lo ione Ca²⁺ contaminante impedendone l'ingresso nella cellula. In queste condizioni non è evidenziabile alcun aumento di [Ca²⁺]_i, ad indicare che l'ATP attiva nelle MSC-1 i recettori P2X, ma non i P2Y. Le cellule MSC-1 sono state stimulate anche con il 2',3'-(4-benzoil)-benzoic-ATP (BzATP), un agonista specifico del recettore P2X₇, in modo da evidenziare la risposta determinata da questo sottotipo recettoriale. Anche in questo caso la stimolazione porta ad un aumento della concentrazione citosolica del calcio, che è maggiore rispetto a quella indotta da ATP, in quanto tende a diminuire (mantenendosi comunque a valori più elevati rispetto al basale) più lentamente (Fig. 10B, pannello di sinistra). Inoltre, è stata analizzata l'induzione dei recettori purinergici P2Y, stimolati preferenzialmente dall'agonista UTP. La Figura. 10C mostra che la risposta al nucleotide è rapida e transiente, come è tipico dei recettori P2Y.

Dall'analisi delle tracce ottenute stimolando le cellule MSC-1 con concentrazioni crescenti di ATP, BzATP e UTP si sono ricavate delle curve dose-dipendenza della risposta Ca²⁺. L'ATP non attiva i recettori P2 per concentrazioni inferiori a 20 μM, mentre la risposta di innalzamento del [Ca²⁺]_i è massimale in risposta ad 1 mM ATP (Fig. 11A). Il BzATP non funziona per concentrazioni inferiori a 10 μM; produce invece una potente attivazione alla concentrazione di 300 μM (Fig. 11B). Infine l'UTP stimola preferenzialmente i recettori P2Y in maniera ottimale alla concentrazione di 300 μM, perde la sua efficacia per concentrazioni inferiori a 30 μM (Fig. 11C).

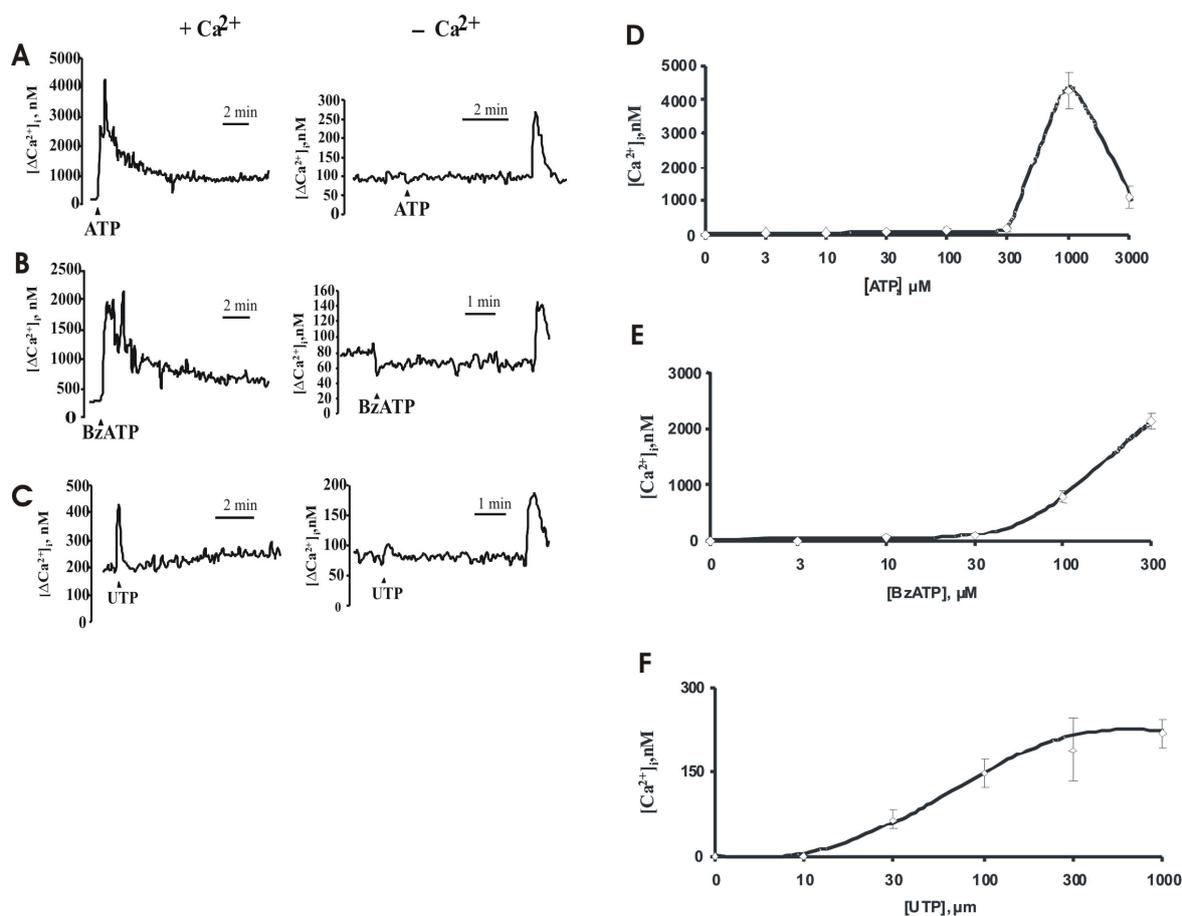


Figura 10. Risposta del calcio in cellule MSC-1. in seguito a stimolazione con nucleotidi purinici e pirimidinici.

(A) Cellule MSC-1 stimolate con 1mM ATP in presenza (pannello di sinistra) o assenza (pannello di destra) di calcio extracellulare. La stimolazione determina un aumento della concentrazione citosolica del calcio che si mantiene elevata per un periodo prolungato. (B, C) Stimolazione della linea cellulare con BzATP e UTP in presenza e assenza di calcio extracellulare. Curva dose-dipendenza della risposta del calcio in seguito a stimolazione con ATP (D), BzATP (E) e UTP (F).

La stimolazione dei recettori purinergici con ATP e BzATP induce permeabilizzazione della membrana plasmatica.

Sono stati valutati i livelli di permeabilizzazione della membrana plasmatica delle cellule MSC-1 in seguito a stimolazione con ATP e BzATP; per far questo sono stati allestiti dei saggi di uptake di marcatori fluorescenti, come il bromuro d'etidio. La stimolazione con i nucleotidi induce l'attivazione dei recettori purinergici tra cui il P2X₇ e, ad alte concentrazioni dello stimolo, si ottiene l'apertura del poro canale (la cui formazione rappresenta una caratteristica peculiare dell'azione del recettore P2X₇) permettendo così al fluorocromo di entrare nella cellula e legarsi al DNA, producendo un aumento della fluorescenza. Dall'analisi di stimolazioni con diverse concentrazioni dei nucleotidi si è ottenuto un grafico che esprime la percentuale di permeabilizzazione in funzione della concentrazione dello stimolo. Come si osserva in figura 11E-F, sia la stimolazione con ATP che quella con il suo analogo BzATP producono una permeabilizzazione della membrana quasi completa. La massima permeabilizzazione si ottiene per concentrazioni di ATP attorno a 1mM. Il BzATP risulta più efficiente, portando ad una permeabilizzazione cellulare massima alla concentrazione di 100 μM.

Per confermare ulteriormente i dati sopra menzionati, sono stati condotti degli esperimenti di analisi di permeabilizzazione del lucifer yellow. Come il bromuro d'etidio anche questa molecola è impermeabile alla membrana plasmatica e può entrare nella cellula solo attraverso la formazione di pori canale. Dal confronto delle immagini acquisite in contrasto di fase ed in fluorescenza si può osservare chiaramente come la somministrazione di ATP o BzATP produca una permeabilizzazione della membrana plasmatica, che si manifesta con l'emissione di fluorescenza da parte del lucifer yellow presente nel citosol (Fig. 11C-D).

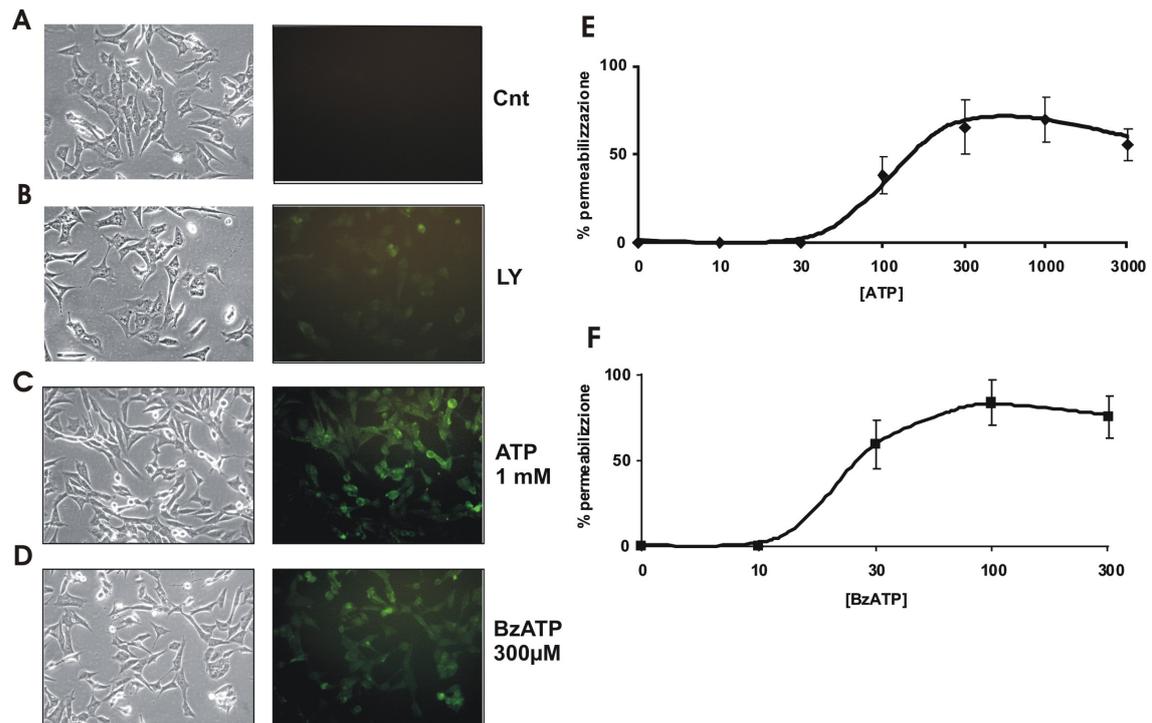


Figura 11. Permeabilizzazione della membrana plasmatica in funzione delle concentrazioni di ATP e BzATP.

(A) Immagini in contrasto di fase e fluorescenza di cellule MSC-1 coltivate in assenza di stimolazione e del colorante. (B) Cellule MSC-1 coltivate in presenza del lucifer yellow. (C-D) Cellule MSC-1 trattate con ATP e BzATP alle concentrazioni indicate, in presenza di lucifer yellow. (E-F) Curva dose-dipendenza della permeabilizzazione delle cellule mieloidi in funzione della concentrazione di ATP e BzATP. Le percentuali di permeabilizzazione sono state ricavate in funzione di quella massima raggiunta con la somministrazione di digitonina.

La stimolazione delle MSC-1 con ATP o BzATP determina depolarizzazione della membrana plasmatica

Sono stati condotti degli esperimenti per studiare gli effetti della stimolazione dei recettori purinergici sul potenziale di membrana delle MSC-1. Le cellule sono state coltivate in presenza di un marcatore fluorescente, il bisoxonolo, che va incontro ad un incremento di fluorescenza in seguito al legame con proteine e fosfolipidi della membrana plasmatica. In caso di diminuzione del potenziale di membrana aumenta la frazione di bisoxonolo legata alla cellula, con un conseguente aumento della fluorescenza.

Le cellule così marcate sono state stimolate in presenza di ATP e BzATP ed analizzate per la quantità di fluorescenza emessa. In presenza di 1mM ATP, le cellule subiscono la massima depolarizzazione della membrana che coincideva con il livello di depolarizzazione totale raggiunto in seguito all'aggiunta di KCl esogeno.

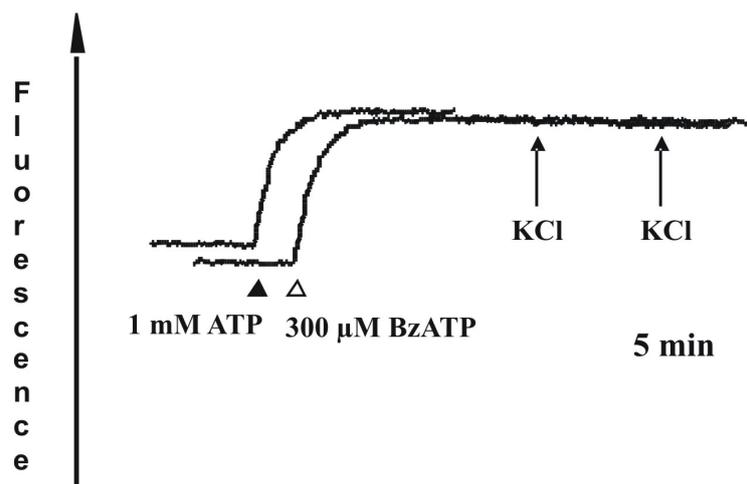


Figura 12. Depolarizzazione della membrana plasmatica in seguito a stimolazione con 1 mM ATP o con 300 μM BzATP. Al termine della registrazione della traccia è stato aggiunto del KCl 30 mM per indurre la massima depolarizzazione della membrana.

La stimolazione con ATP e BzATP induce contrazione cellulare e formazione di microvescicole

La caratterizzazione delle risposte chimico-fisiche mediate dall'attivazione dei recettori purinergici delle cellule MSC-1 si è conclusa con lo studio delle modificazioni morfologiche subite dalle cellule in presenza di ATP e BzATP. Le cellule sono state monitorate in tempo reale durante la stimolazione mediante l'utilizzo del microscopio invertito associato ad una telecamera. Come evidenziato dalle immagini, dopo solo 10 minuti dall'inizio della stimolazione con 1 mM ATP (Fig. 13 A) o con BzATP 300 μ M (Fig. 13 B), le cellule subiscono una contrazione (freccia bianca). In entrambi i casi, è possibile apprezzare anche, fin dai primi minuti di stimolazione, un'intensa attività a livello della membrana cellulare con la formazione di microvescicole (*blebs*, frecce rosse): protuberanze di forma e dimensioni variabili, in continua evoluzione. Alterazioni morfologiche delle cellule sono apprezzabili in presenza delle stesse condizioni di stimolazione ma in un mezzo diverso: salina Na⁺, con EGTA 0.5 mM, un chelante del calcio. Anche in assenza dello ione Ca²⁺ è possibile osservare un'intensa attività nell'intorno della membrana cellulare, con la continua formazione di *blebs* (Fig. 13 C e D).

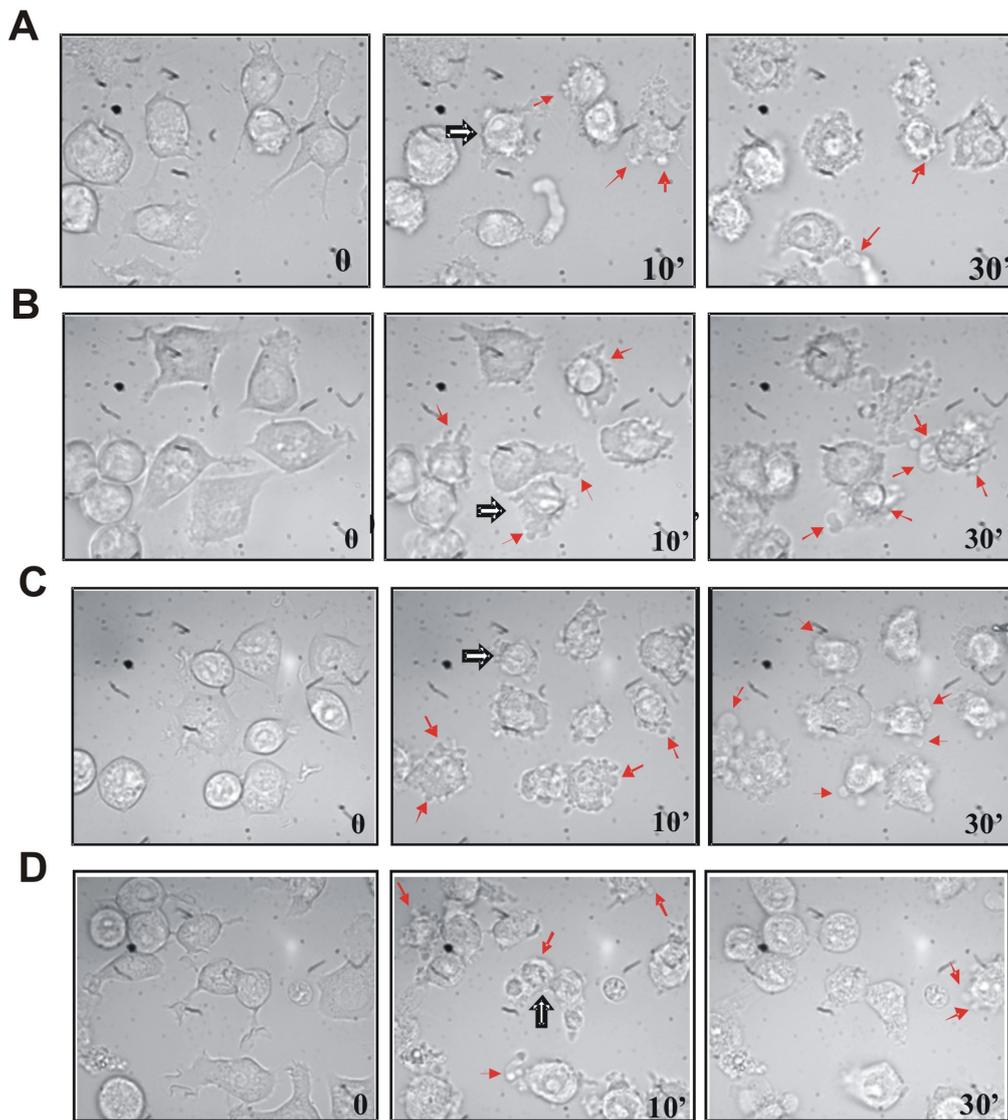


Figura 13. Immagini in contrasto di fase di MSC-1 durante la stimolazione con ATP o BzATP.

(A, B) Stimolazione delle cellule MSC-1 rispettivamente con ATP 1 mM e BzATP 300 μM. in soluzione salina Na⁺, Ca²⁺. (C, D) Stimolazione delle cellule MSC-1 alle stesse concentrazioni indicate nei pannelli A e B in soluzione salina Na⁺, EGTA 0.5 mM. Al tempo zero è stato aggiunto il nucleotide e le immagini sono state acquisite dopo 10 e 30 minuti, come indicato.

La stimolazione con ATP potenzia l'attività citotossica di BM-MDSCs

MDSC sono state differenziate *in vitro*, in presenza delle citochine GM-CSF e IL-6 a partire da cellule di midollo osseo di topi C57BL/6 e topi deficienti per il recettore purinergico P2X₇ (indicati come P2X₇^{-/-}). Le cellule BM MDSC così ottenute sono state coltivate con 1 mM ATP per 24 ore. Al termine della stimolazione, le MDSC sono state raccolte ed analizzate dal punto di vista funzionale, testando la loro capacità di inibire l'attività citolitica di linfociti CTL attivati in una coltura MLPC. Come si può osservare dal pannello A della figura 14, le cellule mieloidi stimolate con 1 mM ATP esercitano una più potente attività immunosoppressoria rispetto alle colture di controllo. Le cellule BM-MDSC derivate da topi knock-out per il recettore P2X₇ non presentano una alterata funzionalità rispetto alle cellule differenziate da topi C57BL/6. Questo dato suggerisce che l'attività citotossica delle cellule mieloidi è sensibile all'ATP ma attraverso una via che non coinvolge il recettore P2X₇. Abbiamo testato lo stato di vitalità delle cellule, ipotizzando che il trattamento con il nucleotide a concentrazioni piuttosto elevate potesse esercitare un effetto tossico sulle cellule. Le cellule sono state marcate con il colorante vitale 7-amino-actinomicina (7AAD), che penetra in cellule in cui la membrana plasmatica non è più integra. La stimolazione per 24 ore non provoca stress cellulare; le percentuali delle cellule 7AAD⁺ nelle colture stimolate con ATP rimangono invariate rispetto a quelle delle colture di controllo (Fig. 14B).

Le cellule sono state caratterizzate fenotipicamente per l'espressione dei marcatori di membrana CD11b e Gr-1 (Fig. 14C). La presenza di ATP extracellulare non sembra produrre delle modificazioni nella distribuzione dei marcatori CD11b e Gr-1. E' invece possibile osservare una differenza di espressione di questi marcatori nei topi P2X₇^{-/-} rispetto ai topi C57BL/6, indipendentemente dallo stimolazione con ATP. Le BM-MDSC derivate da topi P2X₇^{-/-} presentano, infatti, una diversa distribuzione delle tre frazioni mieloidi con un lieve arricchimento delle popolazioni CD11b⁺Gr-1^{hi} e CD11b⁺Gr-1^{int} ed una riduzione di quella CD11b⁺Gr-1^{low}.

La presenza del recettore P2X₇ sulle cellule mieloidi di diversa origine è stata confermata mediante western-blot (Fig. 14D).

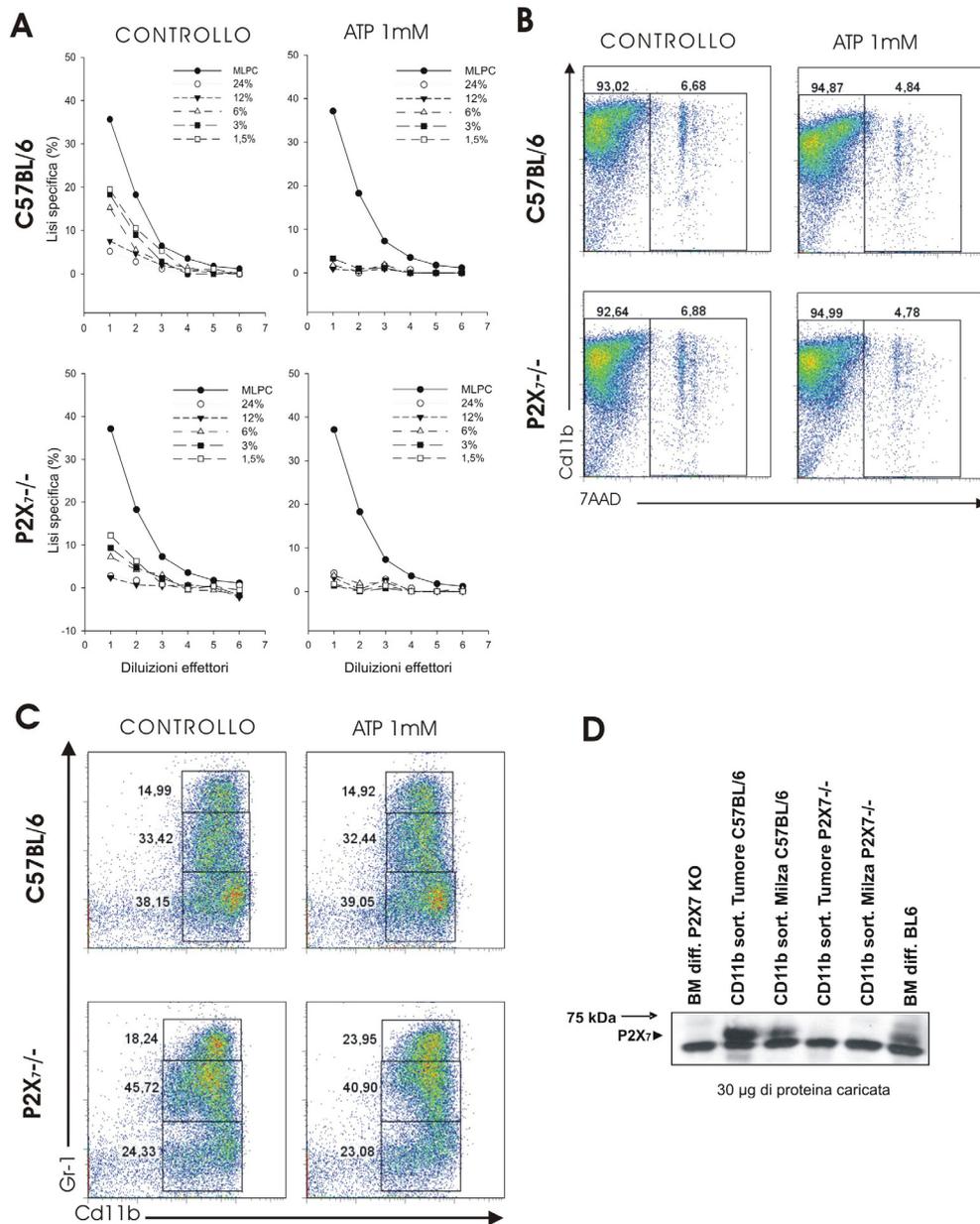


Figura 14. Caratterizzazione fenotipica e funzionale delle BM-MDSC in seguito a stimolazione con ATP.

(A) Analisi dell'attività funzionale di BM-MDSC differenziate a partire da topi C57BL/6 e P2X7^{-/-} in seguito ad una stimolazione con 1 mM ATP per 24 ore. L'attività soppressoria esercitata *in vitro* da queste cellule è stata valutata aggiungendone in diluizioni seriali ad una coltura MLPC allestita con linfociti T CD8⁺ specifici per OVA ottenuti da topi transgenici OT-1, stimolati *in vitro* in presenza del peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄. Dopo cinque giorni l'attività citotossica dei linfociti è stata testata mediante il saggio del rilascio di ⁵¹Cr. (B) Analisi della vitalità cellulare in seguito a stimolazione con 1 mM ATP. Le cellule sono state marcate con il colorante vitale 7AAD per discriminare quelle vive dalle morte. (C) Analisi dell'espressione dei marcatori di superficie CD11b e Gr-1. (D) La presenza del recettore P2X₇ è stata valutata nelle cellule mieloidi differenziate *in vitro* da midollo osseo ed in cellule CD11b sortate da milza e tumore di topi con tumore sottocutaneo.

DISCUSSIONE

Nella prima parte di questo lavoro è stato studiato l'effetto del farmaco 5-FU sulle MDSC. I dati ottenuti mostrano come il 5-FU sia in grado di eliminare selettivamente le cellule mieloidi immature, senza produrre effetti dannosi sulle altre popolazioni leucocitarie. Il farmaco agisce in maniera marcata e duratura sulla frazione CD11b⁺/Gr-1^{int}. Questa frazione cellulare, identificata come quella a più alto potenziale immunosoppressivo (Dolcetti, Peranzoni et al.) risulta essere la popolazione a più alto tasso proliferativo, ma, paradossalmente è la frazione che si ripopola più lentamente. Queste evidenze ci hanno portato a supporre che questa frazione cellulare sia composta da cellule immature e da progenitori multipotenti in grado di ricostituire gli altri subsets mieloidi. L'eliminazione selettiva di questa popolazione da parte del farmaco 5-FU ci ha permesso di apportare nuove conoscenze sulle modalità di azione di queste cellule e sulla loro capacità di indurre tolleranza immunologica. Con i nostri dati abbiamo infatti mostrato che la frazione mieloide a più alta attività soppressoria condivide un comune microambiente nella milza con cellule CD8⁺ T_{CM}. Questo potrebbe spiegare perché nella milza prevalentemente si osserva la soppressione della risposta immunitaria antigene-specifica. Infatti, avendo a disposizione uno spazio confinato si può stabilire uno stretto contatto tra la popolazione mieloide soppressoria e linfociti T CD8⁺ della memoria centrale. Attraverso questa interazione, si attua una tappa fondamentale per l'induzione della tolleranza. Infatti, i meccanismi effettori della soppressione mediata dalle MDSCs come il contatto cellula-cellula, i mediatori solubili che agiscono a corto raggio (come i perossinitriti) e la deplezione dell'aminoacido arginina vengono tutti favoriti da un incontro cellulare in un'area circoscritta (Grohmann and Bronte; Marigo, Dolcetti et al. 2008; Gabrilovich and Nagaraj 2009).

Il ruolo dominante nell'induzione della tolleranza, che emerge dagli esperimenti sugli animali splenectomizzati, insieme ai dati sulla presenza della nicchia tollerogena nella milza e non in altri organi linfoidi secondari e primari, potrebbe spiegare il fatto che le cellule CD11b⁺/Gr-1^{int} vengono facilmente trovate nella milza mentre solo poche cellule sono presenti nei linfonodi drenanti il tumore.

Nella seconda parte del lavoro abbiamo focalizzato la nostra attenzione su di un altro comparto molto importante per la tolleranza, il sito tumorale.

Le MDSC si caratterizzano per una spiccata eterogeneità morfologica, fenotipica e funzionale (Peranzoni, Zilio et al.; Youn and Gabrilovich) che rende molto complessa una loro definizione. Le MDSC presenti nel tumore sono fenotipicamente e funzionalmente diverse da quelle presenti nella milza (Movahedi, Williams et al. 2008) e potrebbero utilizzare dei meccanismi molecolari

addizionali o diversi dalla up-regolazione di arginasi, ossido nitrico e specie reattive dell'ossigeno, già precedentemente descritti (Bronte and Zanovello 2005; Rodriguez and Ochoa 2008; Gabrilovich and Nagaraj 2009). Inoltre, il microambiente tumorale è un comparto estremamente complesso, in cui entrano in gioco diversi tipi cellulari (cellule endoteliali, cellule stromali, cellule immunitarie) a produrre svariati fattori di crescita, enzimi, citochine e mediatori infiammatori. Tra i mediatori dell'infiammazione, un nuovo interesse si sta sviluppando intorno alla molecola ATP, Emerge sempre più chiaramente il ruolo anti-infiammatorio dell'ATP e la forte connessione con l'induzione della risposta immunitaria prima innata e poi acquisita. E' emerso recentemente che l'ATP, come anche l'UTP, rilasciati precocemente da cellule apoptotiche fungono da segnali di pericolo che reclutano fagociti come monociti, macrofagi e DC. E' stato inoltre osservato che eliminando l'ATP dai fattori solubili rilasciati da cellule morenti si abroga il reclutamento di monociti sia *in vitro* che *in vivo* Elliott 2009. Altre evidenze mostrano che l'ATP attivando il recettore P2X7 sulla membrana delle DC, stimola NLRP3/ASC/caspase-1 inflammasoma che a sua volta guida la secrezione dell' IL-1 β necessaria per un'adeguata polarizzazione delle cellule CD8⁺ che producono INF- γ (Aymeric, Apetoh et al.). Esiste quindi una forte correlazione tra l'infiammazione e la risposta immunitaria innata e acquisita e l'ATP svolge un ruolo chiave in questa interazione. Ma, il fatto che il microambiente tumorale sia sorprendentemente ricco in ATP (Ohta, Gorelik et al. 2006; Pellegatti, Raffaghello et al. 2008), e che un suo metabolita svolge una potente azione antinfiammatoria suggeriscono che probabilmente questo nucleotide possa avere un ruolo anche nel modulare la risposta immunitaria.

Noi abbiamo studiato le risposte mediate dai recettori P2 sulle MDSC. Da questi studi è emerso che le cellule mieloidi rispondono allo stimolo con ATP, BzATP e UTP con un drammatico aumento della concentrazione citosolica di calcio. Tuttavia questo livello così elevato dello ione non manda a morte le cellule che riescono, invece, a tamponarlo, in breve tempo, rimanendo vitali. Le cellule non rispondono ad ATP e BzATP in assenza di Ca²⁺, questo significa che l'innalzamento dei livelli di Ca²⁺ intracellulare sono dovuti essenzialmente all'attivazione dei recettori purinergici di tipo ionotropico (P2X) che permettono l'apertura dei canali consentendo l'ingresso nella cellula del Ca²⁺ extracellulare. Il recettore P2X₇ è l'unico della famiglia di questi recettori in grado di formare canali una volta stimolato; per questa sua peculiarità sono state effettuate delle stimolazioni con il BzATP, potente e selettivo agonista del P2X₇. La stimolazione con i nucleotidi produce una completa depolarizzazione della membrana che diventa anche totalmente permeabile all'ingresso di marcatori fluorescenti come il bromuro di etidio.

Da questa prima serie di esperimenti emerge come i recettori P2 espressi dalle cellule mieloidi siano presenti, funzionali ed in grado di indurre risposte potenzialmente importanti nell'inflammatione e nella risposta immunitaria.

Infine, da esperimenti di stimolazione con ATP condotti su BM MDSCs abbiamo potuto osservare come lo stimolo con concentrazioni nucleotidiche paragonabili a quelle riscontrate nel microambiente tumorale sia sorprendentemente in grado di produrre un forte aumento dell'attività immunosoppressoria delle cellule mieloidi. Questo potenziamento funzionale delle BM MDSCs è indipendente dal recettore P2X₇. Questa parte del lavoro, seppur in una fase ancora iniziale, presenta dei dati interessanti che necessitano di ulteriori e accurate indagini.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, S. M., M. M. Tomayko, et al. (2007). "New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets." *J Exp Med* **204**(9): 2103-14.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, et al. (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." *Nat Med* **13**(9): 1050-9.
- Apolloni, E., V. Bronte, et al. (2000). "Immortalized myeloid suppressor cells trigger apoptosis in antigen-activated T lymphocytes." *J Immunol* **165**(12): 6723-30.
- 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.
- Aymeric, L., L. Apetoh, et al. "Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity." *Cancer Res* **70**(3): 855-8.
- Balkwill, F. and L. M. Coussens (2004). "Cancer: an inflammatory link." *Nature* **431**(7007): 405-6.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-52.
- Baniyash, M. (2004). "TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response." *Nat Rev Immunol* **4**(9): 675-87.
- Ben-Baruch, A. (2006). "The multifaceted roles of chemokines in malignancy." *Cancer Metastasis Rev* **25**(3): 357-71.
- 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.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the regulation of gene expression." *Trends Cell Biol* **11**(2): 66-75.
- 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.
- Bouma, M. G., T. M. Jeunhomme, et al. (1997). "Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors." *J Immunol* **158**(11): 5400-8.
- Bours, M. J., E. L. Swennen, et al. (2006). "Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation." *Pharmacol Ther* **112**(2): 358-404.
- 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.
- Brito, C., M. Naviliat, et al. (1999). "Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death." *J Immunol* **162**(6): 3356-66.
- 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. and P. Zanovello (2005). "Regulation of immune responses by L-arginine metabolism." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 641-54.

- 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.
- Burnstock, G. (1972). "Purinergetic nerves." *Pharmacol Rev* **24**(3): 509-81.
- Cella, M., F. Sallusto, et al. (1997). "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." *Curr Opin Immunol* **9**(1): 10-6.
- Chen, Y., R. Corriden, et al. (2006). "ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors." *Science* **314**(5806): 1792-5.
- 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.
- Coutinho-Silva, R., P. M. Persechini, et al. (1999). "P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells." *Am J Physiol* **276**(5 Pt 1): C1139-47.
- Cronstein, B. N., L. Daguma, et al. (1990). "The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively." *J Clin Invest* **85**(4): 1150-7.
- Csoka, B., L. Himer, et al. (2008). "Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function." *Faseb J* **22**(10): 3491-9.
- De Santo, C., P. Serafini, et al. (2005). "Nitrospirin 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.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, et al. (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." *J Exp Med* **204**(6): 1257-65.
- 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.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2005). "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." *J Clin Oncol* **23**(10): 2346-57.
- 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.
- Elliott, M. R., F. B. Chekeni, et al. (2009). "Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance." *Nature* **461**(7261): 282-6.
- Eppell, B. A., A. M. Newell, et al. (1989). "Adenosine receptors are expressed during differentiation of monocytes to macrophages in vitro. Implications for regulation of phagocytosis." *J Immunol* **143**(12): 4141-5.
- Ferrari, D., A. La Sala, et al. (2000). "The P2 purinergetic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release." *Faseb J* **14**(15): 2466-76.

- 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.
- Firestein, G. S., D. A. Bullough, et al. (1995). "Inhibition of neutrophil adhesion by adenosine and an adenosine kinase inhibitor. The role of selectins." *J Immunol* **154**(1): 326-34.
- 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.
- Fountain, S. J., K. Parkinson, et al. (2007). "An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in Dictyostelium discoideum." *Nature* **448**(7150): 200-3.
- Fredholm, B. B. (2007). "Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair." *Cell Death Differ* **14**(7): 1315-23.
- 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.
- 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.
- Gattinoni, L., D. J. Powell, Jr., et al. (2006). "Adoptive immunotherapy for cancer: building on success." *Nat Rev Immunol* **6**(5): 383-93.
- 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.
- 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.
- Green, D. R., T. Ferguson, et al. (2009). "Immunogenic and tolerogenic cell death." *Nat Rev Immunol* **9**(5): 353-63.
- 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.
- Grohmann, U. and V. Bronte "Control of immune response by amino acid metabolism." *Immunol Rev* **236**: 243-64.

- Gunosewoyo, H., M. J. Coster, et al. (2007). "Molecular probes for P2X7 receptor studies." *Curr Med Chem* **14**(14): 1505-23.
- Hasko, G. and B. N. Cronstein (2004). "Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity." *Trends Immunol* **25**(1): 33-9.
- Hasko, G., D. G. Kuhel, et al. (2000). "ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha release from macrophages." *Br J Pharmacol* **129**(5): 909-14.
- Hasko, G., C. Szabo, et al. (1996). "Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice." *J Immunol* **157**(10): 4634-40.
- 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.
- 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.
- Idzko, M., S. Dichmann, et al. (2002). "Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors." *Blood* **100**(3): 925-32.
- 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.
- 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.
- Khakh, B. S. and R. A. North (2006). "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease." *Nature* **442**(7102): 527-32.
- 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.
- Kim, S. Y., M. Sivaguru, et al. (2006). "Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling." *Plant Physiol* **142**(3): 984-92.
- 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. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lutz, M. B., N. A. Kukutsch, 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.
- Majumdar, S. and B. B. Aggarwal (2003). "Adenosine suppresses activation of nuclear factor-kappaB selectively induced by tumor necrosis factor in different cell types." Oncogene **22**(8): 1206-18.
- Mandapathil, M., B. Hilldorfer, et al. "Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells." J Biol Chem **285**(10): 7176-86.
- Mannick, J. B., A. Hausladen, et al. (1999). "Fas-induced caspase denitrosylation." Science **284**(5414): 651-4.
- Marigo, I., E. Bosio, et al. "Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor." Immunity **32**(6): 790-802.
- 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.
- Martinon, F., V. Petrilli, et al. (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-41.
- 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.
- 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.

- Minguet, S., M. Huber, et al. (2005). "Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors." *Eur J Immunol* **35**(1): 31-41.
- Monu, N. and A. B. Frey (2007). "Suppression of proximal T cell receptor signaling and lytic function in CD8+ tumor-infiltrating T cells." *Cancer Res* **67**(23): 11447-54.
- Morales, J. K., M. Kmiecik, et al. "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* **123**(1): 39-49.
- Movahedi, K., M. Williams, et al. (2008). "Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity." *Blood* **111**(8): 4233-44.
- 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.
- 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.
- Novitskiy, S. V., S. Ryzhov, et al. (2008). "Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function." *Blood* **112**(5): 1822-31.
- Ohta, A., E. Gorelik, et al. (2006). "A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(35): 13132-7.
- Ohta, A., A. Ohta, et al. (2009). "A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments." *J Immunol* **183**(9): 5487-93.
- 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.
- 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. (2008). "Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function." *Blood* **111**(1): 219-28.
- Panther, E., S. Corinti, et al. (2003). "Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells." *Blood* **101**(10): 3985-90.
- Panther, E., M. Idzko, et al. (2001). "Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells." *Faseb J* **15**(11): 1963-70.
- 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.
- Pellegatti, P., L. Raffaghello, et al. (2008). "Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase." PLoS One **3**(7): e2599.
- Peranzoni, E., S. Zilio, et al. "Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition." Curr Opin Immunol **22**(2): 238-44.
- 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.
- 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.
- Priceman, S. J., J. L. Sung, et al. "Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy." Blood **115**(7): 1461-71.
- Radi, R. (2004). "Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4003-8.
- Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev **50**(3): 413-92.
- Reiman, J. M., M. Kmiecik, et al. (2007). "Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression." Semin Cancer Biol **17**(4): 275-87.
- Ring, S., A. H. Enk, et al. "ATP activates regulatory T Cells in vivo during contact hypersensitivity reactions." J Immunol **184**(7): 3408-16.
- 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, 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. and A. C. Ochoa (2008). "Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives." Immunol Rev **222**: 180-91.
- 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.
- 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.
- Schnurr, M., T. Toy, et al. (2004). "Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells." *Blood* **103**(4): 1391-7.
- Schnurr, M., T. Toy, et al. (2003). "ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling." *Blood* **102**(2): 613-20.
- 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. Mgebroff, 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 γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* **410**(6832): 1107-11.
- 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. (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.
- Song, X., Y. Krelin, et al. (2005). "CD11b⁺/Gr-1⁺ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1 β -secreting cells." *J Immunol* **175**(12): 8200-8.
- 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.
- 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.
- Sutterwala, F. S., Y. Ogura, et al. (2006). "Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1." *Immunity* **24**(3): 317-27.
- 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.
- 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.
- Thomas, L. (1959). Discussion. In cellular and humoral aspect of the hypersensitive states, H.S. Lawrence, ed. (New York: Hoeber-Harper).
- Tomayko, M. M., S. M. Anderson, et al. (2008). "Systematic comparison of gene expression between murine memory and naive B cells demonstrates that memory B cells have unique signaling capabilities." J Immunol **181**(1): 27-38.
- 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.
- Vincent, J., G. Mignot, et al. "5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity." Cancer Res **70**(8): 3052-61.
- Wu, P. Y., Y. C. Lin, et al. (2009). "Functional decreases in P2X7 receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells." Cell Signal **21**(6): 881-91.
- 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, 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.
- Youn, J. I. and D. I. Gabrilovich "The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity." Eur J Immunol **40**(11): 2969-75.
- 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. (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.
- Zarek, P. E., C. T. Huang, et al. (2008). "A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells." *Blood* **111**(1): 251-9.
- 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, H., D. M. Conrad, et al. (2004). "Adenosine acts through A2 receptors to inhibit IL-2-induced tyrosine phosphorylation of STAT5 in T lymphocytes: role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and phosphatases." *J Immunol* **173**(2): 932-44.
- 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.