

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

**Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche**

**Scuola di Dottorato in Oncologia e Oncologia Chirurgica
Ciclo XXIII**

**Caratterizzazione di una sottopopolazione mieloide
umana analoga ai promielociti e dotata di attività
immunosoppressoria**

Direttore della Scuola: Ch.ma Prof.ssa Paola Zanovello

Supervisore: Dott.ssa Susanna Mandruzzato

Dottoranda: Dott.ssa Erika Falisi

Anno Accademico 2009-2010

Alla mia famiglia

INDICE

	pag.
LISTA DELLE ABBREVIAZIONI	1
ABSTRACT	5
RIASSUNTO	7
1. INTRODUZIONE	9
1.1 Sistema immunitario e immunosorveglianza dei tumori	9
1.2 <i>Immunoediting</i> dei tumori	10
1.3 La tolleranza immunitaria	13
1.4 Cellule T regolatorie	13
1.5 Cellule T <i>natural killer</i>	14
1.6 Macrofagi associati al tumore	16
1.7 Cellule dendritiche immature	16
1.8 Cellule soppressorie di derivazione mieloide	17
1.8.1 Fattori che inducono l'espansione delle MDSC	18
1.8.2 Le MDSC murine	21
1.8.3 Le MDSC nei pazienti affetti da tumore	21
1.8.4 MDSC e immunosoppressione	24
1.8.5 MDSC e progressione tumorale	27
1.8.6 MDSC come possibile bersaglio terapeutico	27
2. SCOPO DELLA TESI	31
3. MATERIALI E METODI	33
3.1 Campioni biologici di aspirato midollare	33
3.2 Trattamento <i>in vitro</i> di cellule di aspirato midollare con l'aggiunta di fattori di crescita	33
3.3 Analisi citofluorimetrica delle cellule di midollo	34

3.4	Saggi di proliferazione	35
3.5	Marcatura delle cellule di midollo con CFSE	36
3.6	Separazione immunomagnetica della frazione CD16 ⁻ /CD11b ^{low/-} dal midollo <i>ex-vivo</i> e dalle BM-MDSC	36
3.7	ELISA (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)	37
3.8	Produzione dell'anticorpo monoclonale specifico per Arginasi I umana e coniugazione dello stesso con il fluorocromo Alexa Fluor 488	37
3.9	Isolamento dei monociti e dei granulociti da <i>buffy coat</i>	38
3.10	Microscopia confocale	39
3.11	Western blot	40
3.12	Preparazione dei citospin	41
3.13	Analisi statistica	42
4.	RISULTATI	43
4.1	Induzione <i>in vitro</i> di MDSC umane a partire da sangue midollare trattato con una combinazione di citochine	43
4.1.1	Caratterizzazione <i>ex-vivo</i> dell'immunofenotipo e dell'attività soppressoria di cellule di aspirato midollare	43
4.1.2	Il trattamento <i>in vitro</i> delle cellule midollari con G-CSF, GM-CSF e IL-6 induce l'espansione di cellule con fenotipo immunosoppressorio.	46
4.1.3	Il trattamento del midollo con la combinazione di G-CSF+GM-CSF induce l'espansione di cellule ad attività immunosoppressoria	50
4.1.4	Il trattamento del midollo con G-CSF+GM-CSF induce l'accumulo di cellule mieloidi immature ad elevata attività soppressoria	54
4.2	Definizione della sottopopolazione delle BM-MDSC ad attività immunosoppressoria	56
4.2.1	Caratterizzazione immunofenotipica della sottopopolazione immunosoppressoria CD16 ⁻ /CD11b ^{low/-}	60

4.2.2	Le cellule soppressorie CD16 ⁻ /CD11b ^{low/-} sono fluorescenti nella lunghezza d'onda del rosso	63
4.2.3	Analisi in microscopia confocale dell'espressione di MPO e Arginasi I nella sottopopolazione immunosoppressoria CD16 ⁻ /CD11b ^{low/-}	68
4.2.4	Caratterizzazione del tipo recettoriale dell'IL4R α espresso dalla sottopopolazione immunosoppressoria CD16 ⁻ /CD11b ^{low/-}	71
4.3	Le BM-MDSC come possibile bersaglio terapeutico di farmaci chemioterapici	73
4.3.1	Effetto del 5-FU sulle BM-MDSC generate <i>in vitro</i>	74
5. DISCUSSIONE		81
BIBLIOGRAFIA		89
RINGRAZIAMENTI		109

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

5-FU: *5-fluorouracil*
7AAD: *7-Aminoactinomycin D*
APC: *antigen presenting cell*
Arg-I: *arginase-I*
ATP: *adenosine triphosphate*
ATRA: *all trans-retinoic acid*
BCR: *B cell receptor*
bFGF: *basic fibroblast growth factor*
BM-MDSC: *bone marrow-derived myeloid-derived suppressor cells*
CCL17: *chemokine (C-C motif) ligand 17*
CCL22: *chemokine (C-C motif) ligand 22*
CCR2: *chemokine (C-C motif) receptor 2*
C/EBP β : *CCAAT/enhancer binding protein β*
CD: *cluster of differentiation*
CFSE: *carboxyl fluorescein succinimidyl ester*
COX-2: *cyclooxygenase-2*
CSF-1: *colony stimulating factor 1*
EDTA: *ethyl diamine tetrachloroacetic acid*
ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*
FBS: *fetal bovine serum*
FcR: *fragment crystallizable receptor*
FLT3: *FMS-like tyrosine kinase 3*
FoxP3: *forkhead box P3*
FSC: *forward scatter*
G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*
GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
HCF: *hanks per citometria a flusso*
HLA: *human leukocyte antigen*
HSC: *hematopoietic stem cells*
Hsp72: *heat shock protein 72*
iDC: *immature dendritic cells*
IDO: *indoleamine 2,3-dioxygenase*

IFN- γ : *interferon- γ*
IL: *interleukin*
IL4R α : *alpha subunit of the interleukin 4 receptor*
IL-13R α 1: *alpha 1 subunit of the interleukin 13 receptor*
IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
iNOS: *nitric oxide synthase inducible*
JAK: *Janus kinases*
Lin: *lineage*
M-CSF: *macrophage colony-stimulating factor*
MDSC: *myeloid-derived suppressor cells*
MFI: *mean fluorescence intensity*
MHC: *major histocompatibility complex*
MLR: *mixed leukocyte reaction*
MMPs: *matrix metalloproteinases*
MPO: *myeloperoxidase*
NAD(P)H: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NF- κ B: *nuclear factor-kappa B*
NK: *natural killer*
NKT: *natural killer T*
NO: *nitric oxide*
OKT-3: *anti-CD3*
PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*
PBS: *phosphate buffered saline*
PDE5: *phosphodiesterase 5*
PDGF: *platelet-derived growth factor*
PDGFR: *platelet-derived growth factor receptor*
PGE₂: *prostaglandin E₂*
PMN: *polymorphonuclear cells*
PVDF: *polyvinylidene fluoride*
RAG-1: *recombination activating gene-1*
RAG-2: *recombination activating gene-2*
ROS: *reactive oxygen species*
SCF: *stem cell factor*

SCCHN: *squamous cell carcinoma of the head and neck*
SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis*
SE: *standard error*
SSC: *side scatter*
STAT1: *signal transducer and activator of transcription 1*
STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*
STAT6: *signal transducer and activator of transcription 6*
TAM: *tumor associated macrophages*
TBS: *tris buffer solution*
TCR: *T cell receptor*
TDEs: *tumor derived exosomes*
TGF- β : *tumor growth factor β*
Th1: *T helper 1*
Th2: *T helper 2*
TLRs: *tool-like receptors*
TMO: *Bone Marrow Transplantation*
TNF- α : *tumor necrosis factor-alpha*
Treg: *T regulatory cells*
TSTA: *tumor-specific transplantation antigen*
VEGF: *vascular endothelial growth factor*
VEGFR1: *vascular endothelial growth factor receptor 1*

ABSTRACT

The ability of the immune system to avoid *self*-reactivity and autoimmune diseases is achieved by central and peripheral tolerance. Immune tolerance is sustained by different population, one of which is represented by myeloid-derived suppressor cells (MDSC). MDSC are a heterogeneous population of cells consisting of myeloid progenitor cells and immature myeloid cells that are able to suppress both adaptative and innate immunity. In pathological conditions, such as cancer, various infectious diseases and autoimmune diseases, the release of soluble factors induce the increase of myelopoiesis and a partial block of the maturation of myeloid cells. These soluble factors are also believed to be involved in the mobilization and activation of MDSC. MDSC was found in tumour-bearing mice but also in cancer patients. While the phenotype of murine MDSC is well defined by specific markers, like Gr-1, CD11b e IL4R α , the immunophenotype of human MDSC is still not well defined. In recent years, both in tumour-bearing mice and in cancer patients, MDSC was identified with granulocytes or monocytes features.

In this work we demonstrated that human MDSC can be induced *in vitro* by cytokine treatment of myeloid progenitors. Our data show that the combination of G-CSF and GM-CSF induce the accumulation of immature myeloid cells (BM-MDSC) with features resembling those we identified in the blood of cancer patients. We also demonstrated that BM-MDSC are able to suppress T cells proliferation and that this suppression is accompanied by the downregulation of CD3 ζ and CD3 ϵ chains and by the reduction of IFN- γ secreted by activated lymphocyte.

Since BM-MDSCs consist of a heterogeneous population, we focused our research to identify the subpopulation of BM-MDSC characterized by the suppressive activity. We demonstrated that human MDSC are immature cells blocked in a particular stage of differentiation. This cells, identified by the phenotype CD16 $^-$ /CD11b $^{low/-}$, showed morphological features of *ex-vivo*-bone marrow isolated promyelocytes but, unlike these, they are smaller, less grainy, and are able to suppress T lymphocyte proliferation also by CD3 ϵ downregulation. We also observed that the suppressive subpopulation is composed by other two fractions that distinguish each other by a different emission in the red wavelenght, a different grain and a different ability to suppress T lymphocyte proliferation.

In the second section of this work we focused in the evaluation of chemotherapy on the accumulation and the functionality of MDSC, one of the main population involved in tumor immunosuppression and in the failure of immunotherapy. Our data showed that, in analogy to the results obtained in mice, *5-fluorouracil* is able to remove the suppressive effect of BM-MDSCs on T lymphocyte proliferation. These observation allow us to suggest the use of chemotherapy like adjuvant in immunotherapy approaches.

RIASSUNTO

Il sistema immunitario è in grado di bloccare il riconoscimento degli antigeni *self* e quindi lo sviluppo di risposte autoimmunitarie mediante il mantenimento della tolleranza immunitaria. Tale fenomeno viene sostenuto dall'azione di diverse popolazioni cellulari tolerogeniche, una delle quali è rappresentata dalle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC). Le MDSC sono una popolazione molto eterogenea composta da cellule mieloidi immature caratterizzate dalla capacità di sopprimere sia la risposta immunitaria innata che quella adattativa. È stato ipotizzato che in condizioni patologiche, quali infezioni, malattie autoimmunitarie e neoplasie, il rilascio di diversi fattori di crescita induca l'aumento della mielopoiesi ed il blocco maturativo delle cellule mieloidi che si accumulano in uno stato di immaturità. Tali fattori solubili sono inoltre ritenuti coinvolti nella mobilitazione e nell'attivazione delle MDSC. Le MDSC sono state identificate sia nel modello murino che in pazienti affetti da tumore. Mentre il fenotipo delle MDSC murine è facilmente identificabile mediante l'uso di marcatori specifici (Gr-1, CD11b e IL4R α), le caratteristiche immunofenotipiche delle MDSC umane non sono ancora state definite. Nonostante questo, sia nel modello murino che nei pazienti affetti da tumore, le MDSC si sono dimostrate avere caratteristiche talvolta granulocitarie e talvolta monocitarie.

In questo lavoro abbiamo dimostrato che è possibile indurre, *in vitro*, la generazione di MDSC umane a partire da precursori midollari coltivati in presenza di diversi fattori solubili, tra i quali il G-CSF ed il GM-CSF. Il nostro studio ha dimostrato che l'uso combinato di G-CSF e di GM-CSF permette di indurre l'accumulo di cellule mieloidi immature (BM-MDSC) con caratteristiche simili a quelle da noi identificate nel sangue di pazienti affetti da tumore. Le BM-MDSC sono in grado di inibire la proliferazione di linfociti T attivati sia con mitogeni che con allo-antigeni. Inoltre abbiamo dimostrato che la soppressione mediata dalle BM-MDSC è associata sia alla diminuzione dell'espressione delle catene ζ ed ϵ del CD3 che alla riduzione della produzione di IFN- γ secreto dagli stessi linfociti T.

Considerando l'elevata eterogeneità delle BM-MDSC, in questo lavoro abbiamo cercato di identificare quali sottopopolazioni di BM-MDSC fossero responsabili dall'attività soppressoria. Mediante esperimenti di *sorting* cellulare abbiamo

dimostrato, che le BM-MDSC sono cellule immature ascrivibili ad un preciso stadio di differenziazione. Queste cellule, definite dal fenotipo CD16⁻/CD11b^{low/-}, presentano infatti caratteristiche morfologiche simili ai promielociti isolati dal midollo *ex-vivo* ma, a differenza di queste, sono caratterizzate da una minore granulosità, da maggiori dimensioni e dalla capacità di sopprimere la proliferazione linfocitaria accompagnata anche dalla diminuzione dell'espressione della catena ϵ del CD3 espressa sulla superficie dei linfociti T. Abbiamo inoltre evidenziato l'eterogeneità di questa frazione dimostrando che, al suo interno, si possono identificare altre due sottopopolazioni caratterizzate da una diversa fluorescenza nella lunghezza d'onda del rosso, da una diversa granulosità e da una diversa attività soppressoria.

Nella seconda parte del lavoro ci siamo concentrati sulla valutazione degli effetti della chemioterapia sull'accumulo e sulla funzionalità delle MDSC, una delle principali popolazioni cellulari coinvolte nell'immunosoppressione associata ai tumori e responsabili dell'inefficacia delle terapie immunoterapiche. I dati da noi ottenuti dimostrano che, come osservato nel modello murino, l'aggiunta del 5-*fluorouracile* a basse dosi è in grado di indurre l'eliminazione dell'attività soppressoria delle BM-MDSC nei confronti dei linfociti T. Queste osservazioni permettono di suggerire il possibile utilizzo di alcuni chemioterapici come adiuvanti nei trattamenti immunoterapici, in quanto in grado di eliminare una delle popolazioni coinvolte nell'immunosoppressione associata ai tumori.

1. INTRODUZIONE

1.1 Sistema immunitario e immunosorveglianza dei tumori

L'idea che il sistema immunitario fosse in grado di riconoscere ed eliminare un tumore primario ebbe origine già nei primi anni del '900 anche se allora non fu possibile testare sperimentalmente questa ipotesi a causa delle scarse conoscenze nell'ambito dell'immunologia molecolare e cellulare ¹. Nella metà del secolo scorso Medawar e colleghi definirono il ruolo chiave delle cellule del sistema immunitario nel rigetto dei trapianti ². Esperimenti di trapianto di tumori realizzati in topi singenici dimostrarono che neoplasie indotte da carcinogeni chimici potevano provocare una reazione di rigetto diretta contro lo stesso tumore, condizione che non si verificava se lo stesso tumore veniva reimpiantato nell'ospite originario. La protezione contro il tumore primario fece ipotizzare, per la prima volta, che le cellule tumorali potessero esprimere antigeni di rigetto, che furono denominati TSTA (*tumor specific trasplantation antigen*) per le analogie esistenti tra il rigetto di un tumore ed il rigetto di un allotrapianto ³.

Basandosi sulle emergenti scoperte nel campo dell'immunologia e dei trapianti, Burnet e Thomas proposero la teoria dell'immunosorveglianza secondo la quale le cellule tumorali originano frequentemente in un organismo ma vengono rigettate dal sistema immunitario mediante il riconoscimento degli antigeni caratteristici delle cellule tumorali ⁴. Nonostante vi fossero numerose evidenze sperimentali a favore del coinvolgimento del sistema immunitario nell'eliminazione delle cellule trasformate, la teoria dell'immunosorveglianza fu ben presto messa in discussione dall'osservazione che in topi atimici, in confronto agli animali *wild type*, non vi fosse un aumento dell'incidenza di tumori spontanei o indotti chimicamente ⁵⁻⁶.

Negli anni '90 del secolo scorso, lo sviluppo di tecniche di *gene-targeting*, di topi transgenici e di anticorpi monoclonali neutralizzanti permisero di scoprire altri elementi chiave che rinnovarono l'interesse per la teoria dell'immunosorveglianza definendo il coinvolgimento del sistema immunitario, sia innato che adattativo, nel controllo dello sviluppo di un tumore primario. Per prima cosa, fu identificato il ruolo dell'*interferon gamma* endogeno (IFN- γ) nella protezione dell'ospite contro la crescita di tumori trapiantati e la formazione di tumori primari indotti da carcinogeni chimici o spontanei. I ricercatori infatti osservarono che fibrosarcomi immunogenici

erano in grado di crescere più rapidamente e più efficacemente in topi trattati con anticorpi monoclonali neutralizzanti l'IFN- γ ⁷. Un'altro tassello fu rappresentato dalla scoperta che la perforina, componente dei granuli citolitici dei linfociti T citotossici e delle NK, risultava essere importante per l'eliminazione delle cellule tumorali. L'osservazione sperimentale fu ottenuta utilizzando un modello murino mancante della perforina (C57BL/6 perforina^{-/-}) che risultava essere più soggetto alla formazione di tumori sia spontanei sia indotti da carcinogeni chimici⁸⁻¹¹. Il lavoro che supportò definitivamente la teoria dell'immunosorveglianza dei tumori, dipendente dai linfociti, provenne da esperimenti condotti su topi deficienti dei geni (RAG-1) o RAG-2. Questi geni sono espressi esclusivamente nel comparto linfoide e codificano per gli enzimi coinvolti nella ricombinazione del recettore dei linfociti T (TCR) e B (BCR) e nella riparazione di danni al DNA; la mancanza di espressione di tali geni rende i topi RAG1^{-/-} e RAG2^{-/-} privi del compartimento linfocitario¹² e, quindi, più suscettibili all'insorgenza di tumori sia spontanei che indotti da carcinogeni chimici¹³.

1.2 *Immunoediting* dei tumori

Gli studi condotti nel corso degli anni hanno dimostrato che l'interazione tra il sistema immunitario ed il tumore è molto più complessa di quanto inizialmente ipotizzato dalla teoria dell'immunosorveglianza e che la protezione dall'insorgenza del tumore dipende non solo dalla risposta immunitaria adattativa ma anche da quella innata. Studi effettuati su modelli murini hanno dimostrato che i tumori che si formano in assenza di un sistema immunitario intatto sono molto più immunogenici di quelli che si formano in individui immunocompetenti e che il sistema immunitario determina una pressione selettiva sui tumori generando varianti tumorali con ridotta immunogenicità². Considerando, quindi, che il sistema immunitario esercita sia un'azione antitumorale che un'azione di "rimodellamento" del tumore verso una minore immunogenicità, il termine "immunosorveglianza dei tumori" non è più stato ritenuto adeguato per descrivere tale processo. Dalla teoria dell'immunosorveglianza si è quindi passati alla teoria dell'*immunoediting* proposta da Robert Schreiber nel 2002^{2,14}: questa teoria ipotizza che la relazione tra tumore e sistema immunitario sia costituita da tre fasi successive: eliminazione, equilibrio ed *escape*.

La fase di eliminazione rappresenta il concetto originale di immunosorveglianza: in questa fase, infatti, le cellule tumorali vengono eliminate dalle cellule del sistema immunitario sia innato che adattativo ¹⁵.

Nella fase di equilibrio il sistema immunitario e le varianti di cellule tumorali che sono sopravvissute alla fase dell'eliminazione entrano in una fase di equilibrio dinamico durante la quale i linfociti T e l'IFN- γ esercitano una potente pressione selettiva sulle cellule tumorali che sono geneticamente instabili. Sebbene molte delle varianti originali del tumore vengono eliminate dal sistema immunitario, in questa fase di selezione *darwiniana* si generano nuove varianti in grado di resistere all'attacco del sistema immunitario.

Nella fase finale, ovvero quella dell'*escape*, le varianti tumorali selezionate durante la fase di equilibrio si espandono in modo incontrollato e sviluppano cambiamenti genetici ed epigenetici che inducono la progressione tumorale.

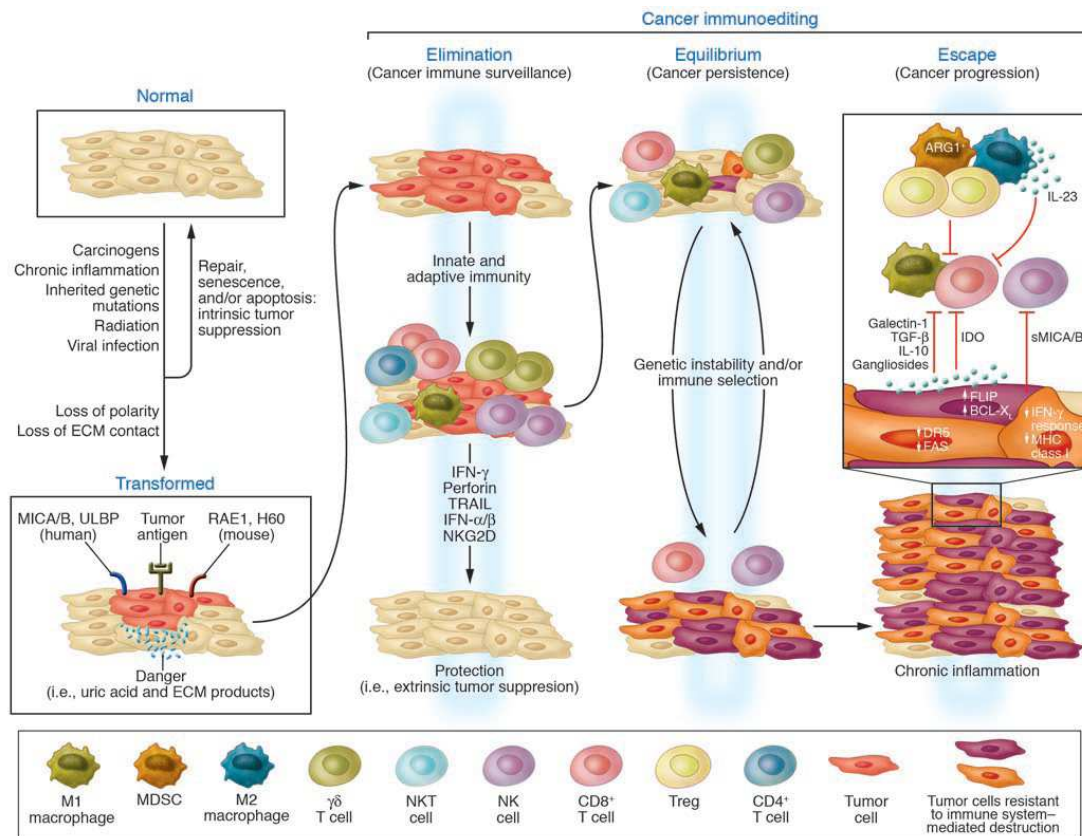


Figura 1. Il processo dell'immunoediting: la teoria delle tre E

La teoria dell'immunoediting dei tumori nasce dall'osservazione che il sistema immunitario è in grado di esercitare sia un'azione antitumorale sia un'azione di promozione della crescita tumorale. Il processo di immunoediting è composto da tre fasi: eliminazione, o immunosorveglianza dei tumori; equilibrio, una fase di dormienza del tumore durante la quale le cellule neoplastiche ed il sistema immunitario entrano in una stato di equilibrio dinamico che mantiene sotto controllo l'espansione del tumore e durante la quale si sviluppano varianti tumorali meno immunogeniche; escape, fase in cui le cellule tumorali prendono il sopravvento sul sistema immunitario con conseguente progressione della crescita tumorale. La figura è tratta da *Immune surveillance of tumors*, Swann J.B. and Smyth M.J., *J. Clin. Invest.*, 2007.

Il tumore può bloccare lo sviluppo di un'adeguata risposta immunitaria sia agendo direttamente sulle cellule del sistema immunitario (azione diretta), sia reclutando cellule in grado di esercitare un'attività immunosoppressoria (azione indiretta)^{2,16}.

Le cellule tumorali secernono inoltre diversi fattori solubili, quali VEGF (*vascular endothelial growth factor*), IL-10, TGF- β (*tumor growth factor β*) e PGE₂ (*prostaglandin E₂*), che, agendo in un modo autocrino, facilitano la crescita tumorale ed inoltre reclutano cellule stromali, quali fibroblasti e macrofagi tumore-associati

(TAM) che sostengono il processo tumorigenico. Le cellule neoplastiche inoltre reclutano ed espandono popolazioni di cellule ad attività tolerogena, quali linfociti T regolatori, cellule dendritiche immature, TAM e cellule soppressorie di derivazione mieloide, che agiscono sopprimendo la risposta immunitaria sia innata che adattativa¹⁷.

1.3 La tolleranza immunitaria

Per evitare il riconoscimento degli antigeni *self* il sistema immunitario ha sviluppato una serie di meccanismi in grado di mantenere la tolleranza immunitaria, fondamentale anche per la prevenzione delle malattie autoimmuni. Le cellule tumorali, a causa della loro origine *self*, possono sfruttare i meccanismi di tolleranza immunitaria per sfuggire all'attacco del sistema immunitario. A tale scopo le cellule neoplastiche rilasciano fattori solubili che inducono l'espansione di cellule ad attività tolerogena che vengono richiamate nel sito tumorale dove esercitano la loro funzione inibitoria favorendo la crescita del tumore.

Le principali cellule implicate nel mantenimento della tolleranza immunitaria sono:

- cellule T regolatorie (Treg)
- cellule T *natural killer* (NKT)
- macrofagi associati al tumore (TAM)
- cellule dendritiche immature (iDC)
- cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC)

1.4 Cellule T regolatorie

Le cellule T regolatorie rappresentano i mediatori principali del mantenimento della tolleranza immunitaria ed agiscono sopprimendo una grande varietà di risposte immunitarie sia fisiologiche che patologiche contro antigeni *self* e non *self*¹⁸⁻¹⁹.

Le Treg originano nel timo e sono presenti negli individui sani fin dalla nascita; possono però anche essere indotte in periferia a partire da cellule T *naive* in particolari condizioni, tra le quali la presenza di alti livelli di TGF- β ¹⁹⁻²⁰. Sono definite dall'espressione dei marcatori di superficie CD4 e CD25 e dal fattore trascrizionale FoxP3 e rappresentano fisiologicamente circa il 10% dei linfociti T CD4⁺; studi condotti su pazienti affetti da diversi tipi di tumore hanno evidenziato

un'elevata espansione di tali cellule sia nella massa tumorale che nei linfonodi drenanti ¹⁸. Dati ottenuti in modelli sperimentali murini hanno dimostrato che la mancanza delle Treg induce lo sviluppo di malattie autoimmunitarie evidenziando il ruolo cruciale di tale popolazione cellulare nel mantenimento della tolleranza immunitaria ^{19,21-22}. Nell'uomo si è inoltre osservato che mutazioni nel gene codificante per FoxP3 provocano lo sviluppo di diverse patologie autoimmunitarie tra le quali diabete di tipo I, allergie e infiammazioni del tratto intestinale ¹⁸; queste osservazioni suggeriscono un ruolo chiave di FoxP3 nello sviluppo, nel mantenimento e nella funzionalità delle Treg ²⁰.

Le Treg vengono attivate dal riconoscimento antigenico, ma esercitano la loro attività inibitoria in modo antigene-indipendente mediante il rilascio di citochine (IL-10, TGF- β , IL-35) ²³⁻²⁵, di sostanze che mediano la lisi cellulare (*granzyme*, perforina) ²⁶⁻²⁷, di adenosina (generata dagli enzimi CD39 e CD73 a partire dall'ATP extracellulare) ²⁸⁻³⁰ e attraverso la modulazione della maturazione e della funzionalità delle cellule dendritiche ²⁰.

1.5 Cellule T *natural killer*

Le cellule T *natural killer* furono inizialmente identificate come cellule T esprimenti il CD3 ma caratterizzate anche dall'espressione del marcatore NK1.1 tipico delle NK e, per questo motivo, furono denominate cellule NKT ³¹⁻³². Fu inoltre messa in evidenza la capacità di queste cellule di riconoscere glicolipidi presentati da molecole CD1d, molecole funzionalmente simili alle molecole MHC di classe I ³³.

Le NKT rappresentano un collegamento tra il sistema immunitario innato e quello adattativo; come cellule del sistema immunitario innato le NKT partecipano alle risposte immunitarie primarie contro le infezioni per poi orchestrare una successiva risposta adattativa ³⁴. Le NKT giocano un ruolo chiave nella regolazione della tolleranza immunitaria dopo un trapianto, nelle malattie autoimmunitarie, nelle patologie allergiche e nell'asma, nelle risposte infiammatorie e nelle patologie infettive ³³. Recentemente si è inoltre osservato che le NKT sono in grado di inibire una adeguata risposta antitumorale ³¹⁻³². Numerose osservazioni sperimentali suggeriscono, inoltre, che questa popolazione abbia sia funzioni immunoregatorie che proinfiammatorie: le NKT infatti producono una grande varietà di citochine comprese quelle secrete dai linfociti T di tipo Th1, come l'IL-10, e Th2, come l'IL-4.

Le NKT si suddividono in tipo I e tipo II a seconda del riarrangiamento del TCR da loro presentato e a seconda della funzione da loro svolta ³¹. Le NKT di tipo I, o cellule NKT classiche, utilizzano la catena invariante V α 14J α 18 del TCR e svolgono, attraverso un meccanismo Th1-dipendente, una funzione di immunosorveglianza. Le NKT di tipo I possono altresì svolgere una funzione soppressoria sui linfociti T: attraverso l'induzione della produzione di citochine di tipo Th2, tali cellule possono inibire lo sviluppo di risposte autoimmunitarie e provocare l'asma. Le cellule NKT di tipo II invece utilizzano altri riarrangiamenti della catena α del TCR e presentano una funzione proinfiammatoria e tolerogenica che viene esplicita attraverso meccanismi Th2-dipendenti. Le due sottopopolazioni di NKT sono in grado di regolarsi a vicenda creando quindi un nuovo asse immunoregolatorio in grado di modulare la risposta immunitaria. Inoltre le NKT possono regolare altre cellule del sistema immunitario innato, tra le quali le cellule dendritiche, le MDSC e le NK ³¹⁻³².

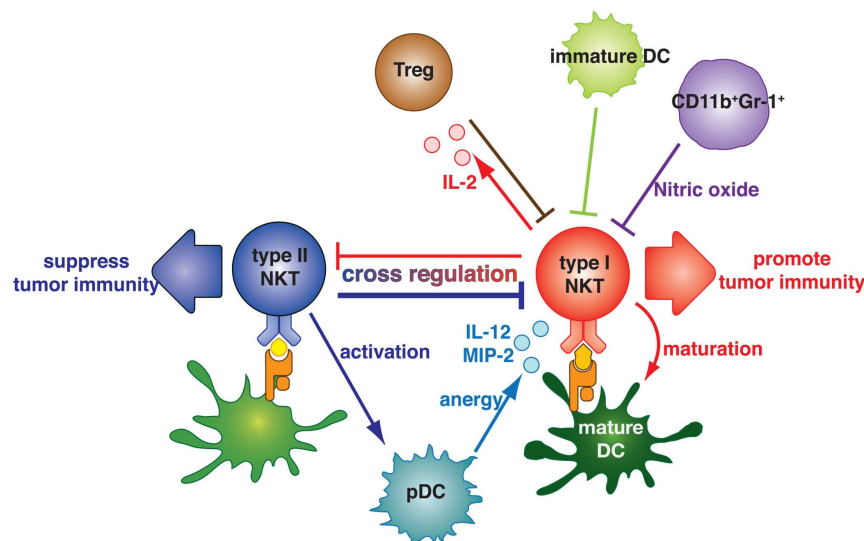


Figura 2. Cross-regolazione delle NKT di tipo I e di tipo II

Le NKT di tipo I e II sono in grado di regolarsi a vicenda e creare quindi un nuovo asse immunoregolatorio in grado di modulare la risposta immunitaria. Le NKT di tipo II sopprimono l'immunità tumorale ma sono anche in grado di inibire le NKT di tipo I. L'attivazione delle NK di tipo I induce la maturazione delle cellule dendritiche e lo sviluppo di una risposta antitumorale. E' stato anche ipotizzato che le Treg possano essere indotte dall'attivazione delle NKT sulle quali esercitano la loro attività immunosoppressoria. Le cellule dendritiche immature e le MDSC possono inoltre sopprimere le NKT di tipo I. La figura è tratta da *The role of NKT cells in tumor immunity*, Terabe M. and Berzofsky J.A., *Adv. Cancer Res.*, 2008.

1.6 Macrofagi associati al tumore

I macrofagi rappresentano una componente fondamentale del sistema immunitario innato e sono in grado di indurre il reclutamento e l'attivazione dei linfociti T promuovendo lo sviluppo di una risposta immunitaria specifica. I macrofagi però rappresentano anche la principale componente leucocitaria infiltrante il tumore ³⁵.

I macrofagi M1, o macrofagi classici, si attivano in risposta a prodotti microbici o dopo esposizione a IFN- γ ; sono caratterizzati da un'elevata capacità di presentare l'antigene, da un'elevata produzione di IL-12 e IL-23 e dalla capacità di indurre l'attivazione di una risposta linfocitaria Th1 ³⁶. I macrofagi M1 inoltre sono in grado di eliminare le cellule tumorali attraverso l'espressione di alti livelli di composti tossici tra i quali l'ossido nitrico, specie reattive dell'ossigeno (ROS = *reactive oxygen species*) e TNF- α ³⁷.

I macrofagi M2, invece, vengono attivati da diversi segnali, tra i quali l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 e glucocorticoidi ³⁷, e sono coinvolti nella riparazione tissutale, nella regolazione immunitaria e nella progressione tumorale ³⁵⁻³⁶. I macrofagi associati al tumore hanno un fenotipo di tipo M2 e vengono richiamati nel microambiente tumorale da citochine, quali IL-10, CSF-1, VEGF, PDGF e M-CSF, e chemochine, quali CCL17 e CCL22, rilasciate dalle cellule tumorali e da proteine derivate dal processo di degradazione della matrice extracellulare, come fibrinogeno e fibronectina. I TAM sono inoltre in grado di influenzare direttamente la crescita neoplastica ed il processo angiogenetico; attraverso il rilascio di IL-1 e TNF- α sono infatti in grado di indurre l'attivazione costitutiva di NF- κ B nelle cellule tumorali che acquisiscono così un fenotipo più aggressivo ³⁵. I TAM inoltre producono enzimi, quali le metalloproteasi (MMPs), che regolano la digestione della matrice extracellulare ed agiscono promuovendo l'angiogenesi ³⁸.

1.7 Cellule dendritiche immature

Le cellule dendritiche sono necessarie per la presentazione dell'antigene ai linfociti T e per la loro completa attivazione. Diversi fattori solubili rilasciati dal tumore, quali VEGF, IL-10 e TGF- β , sono in grado di indurre il blocco della maturazione delle cellule dendritiche che fuoriescono dal midollo osseo in uno stadio di elevata

immaturità. Le cellule dendritiche immature (iDC) sono in grado di catturare gli antigeni e di presentarli ma, non esprimendo le molecole costimolatorie, non sono in grado di indurre la completa attivazione dei linfociti T che entrano quindi in uno stato di anergia.

Le iDC sono in grado di sopprimere la proliferazione sia dei linfociti T CD4⁺ che CD8⁺ e sono anche in grado di indurre le Treg a partire da linfociti T *naive*³⁹⁻⁴⁰. Le Treg così indotte sono a loro volta in grado di indurre la diminuzione dell'espressione delle molecole costimolatorie CD80/CD86 sulle cellule dendritiche di derivazione midollare⁴¹.

Le iDC svolgono la loro azione tolerogenica anche attraverso l'espressione dell'enzima immunosoppressivo IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*) che, rimuovendo il triptofano dal microambiente tumorale, inibisce la proliferazione e la differenziazione linfocitaria¹⁶. La soppressione linfocitaria mediata dalle iDC viene esplicata anche attraverso la produzione di ROS, di IL-10 e di TGF-β che vengono rilasciati dalle iDC dopo aver captato gli antigeni delle cellule tumorali apoptotiche⁴¹.

1.8 Cellule soppressorie di derivazione mieloide

Le MDSC, identificate più di vent'anni fa nella milza di topi portatori di tumore⁴², furono inizialmente definite come cellule "soppressorie naturali"⁴³. Negli anni successivi, cellule con caratteristiche simili furono identificate anche in pazienti affetti da carcinoma squamoso della testa e del collo⁴⁴ e nel midollo osseo di topi affetti da carcinoma polmonare⁴⁵. Queste cellule furono definite cellule soppressorie sulla base della loro capacità di bloccare l'attivazione dei linfociti T e di promuovere la progressione tumorale. Studi successivi dimostrarono che queste cellule soppressorie erano di origine mieloide e vennero quindi denominate MDSC⁴⁶.

Le MDSC sono una popolazione molto eterogenea di cellule comprendenti sia progenitori mieloidi che cellule mieloidi immature⁴⁷⁻⁴⁸. Nei soggetti sani le cellule mieloidi immature, che prendono origine nel midollo osseo, differenziano rapidamente in granulociti maturi, monociti o cellule dendritiche. In condizioni patologiche, tra le quali le neoplasie, le infezioni, la sepsi, i traumi, i trapianti di midollo osseo e alcune malattie autoimmunitarie, vi può essere un blocco parziale del

processo maturativo delle cellule mieloidi immature e si ipotizza che in queste condizioni esse acquisiscano un fenotipo immunosoppressorio ⁴⁷.

Le MDSC sono in grado di inibire l'attivazione dei linfociti T in maniera sia antigene-dipendente che antigene-indipendente; la soppressione mediata dalle MDSC, inoltre, richiede il contatto cellulare ed è diretta in egual misura sia sulle cellule CD4⁺ che CD8⁺. Le MDSC, oltre a sopprimere l'attivazione linfocitaria, sono in grado di perturbare l'immunità innata interagendo con i macrofagi, le cellule *natural killer* (NK) e le NKT. I macrofagi M1, quando attivati, promuovono la regressione tumorale ma, in presenza delle MDSC, acquisiscono un fenotipo di tipo M2 e favoriscono la progressione tumorale ⁴⁹; questa ripolarizzazione dei macrofagi induce un incremento della produzione di IL-10 da parte delle MDSC ed una diminuzione della produzione di IL-12 da parte dei macrofagi ⁵⁰. L'interazione tra NK o NKT e MDSC dipende dal tipo cellulare coinvolto. Alcune sottopopolazioni di NK, infatti, sopprimono l'attività citotossica delle stesse NK attraverso la riduzione dell'IFN- γ da loro prodotto ⁵¹⁻⁵², mentre altre sottopopolazioni attivano le NK che agiscono eliminando le MDSC ⁵³. Lo stesso vale per l'interazione tra le MDSC e le NKT: le NKT di tipo II, producendo IL-13, inducono un accumulo di MDSC e macrofagi M2 favorendo così la progressione tumorale ^{49,54}, mentre le NKT di tipo I riducono l'accumulo delle MDSC ⁵⁵.

1.8.1 Fattori che inducono l'espansione delle MDSC

Le cellule tumorali secernono fattori solubili che verosimilmente inducono un aumento della mielopoiesi ed il blocco differenziativo delle cellule mieloidi che, nel midollo osseo, si espandono in uno stadio di elevata immaturità. Tali cellule poi fuoriescono dal midollo osseo, entrano nella circolazione sistemica e si accumulano nel sito tumorale e negli organi linfoidi secondari dove esercitano la loro attività soppressoria nei confronti dei linfociti T che non risultano più essere in grado di indurre un'efficace risposta antitumorale ¹⁷.

L'accumulo delle MDSC è influenzato anche da fattori rilasciati dagli stessi linfociti T attivati e/o dalle cellule stromali ⁴⁷. Sono stati descritti diversi fattori coinvolti nel reclutamento delle MDSC quali COX-2 ⁵⁶, prostaglandine ⁵⁷⁻⁵⁹, SCF (*stem-cell factor*) ⁵⁷, M-CSF (*macrophage colony-stimulator factor*), IL-6 ⁶⁰, GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulator factor*) ⁵⁹ e VEGF ⁶¹⁻⁶². Il segnale

mediato da molti di questi fattori converge nella cascata di trasduzione del segnale di JAK e STAT3 (JAK = *Janus kinase*, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription-3*) che sono molecole coinvolte nei meccanismi molecolari che regolano la sopravvivenza, la proliferazione, il differenziamento cellulare e l'apoptosi. Nelle cellule tumorali umane e murine è stata osservata un'attivazione costitutiva di STAT3 che non sembra essere coinvolto solo nella regolazione della sopravvivenza delle cellule neoplastiche: è stato ipotizzato che l'aumentata espressione di tale fattore trascrizionale possa anche rappresentare un evento chiave nella regolazione dell'espansione delle MDSC⁶³⁻⁶⁴. Evidenze sperimentali suggeriscono che una anormale o persistente attivazione di STAT3 nei progenitori mieloidi impedisca la loro differenziazione in cellule mieloidi mature e favorisca, quindi, l'espansione delle MDSC⁶⁵. Recenti evidenze suggeriscono, inoltre, che STAT3 regoli l'espansione delle MDSC attraverso l'induzione dell'espressione di due proteine proinfiammatorie, S100A8 e S100A9. L'aumento della produzione di queste due proteine si è dimostrato prevenire la differenziazione delle cellule mieloidi con conseguente espansione delle MDSC nella milza di topi transgenici *naive* o portatori di tumore aventi alti livelli di S100A9⁶⁴; entrambe le proteine si sono inoltre dimostrate essere in grado di indurre la migrazione delle MDSC al sito tumorale in topi portatori di tumore⁶⁶.

Un fattore trascrizionale legato alla via di trasduzione del segnale di JAK-STAT3 è c\EBP β ⁶⁷. Questo fattore trascrizionale, che può essere indotto anche da G-SCF (*granulocyte colony-stimulating factor*) e GM-CSF, è considerato un regolatore chiave della granulopoiesi di emergenza. Il c\EBP β , appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione c\EBP, è inoltre coinvolto nella regolazione della crescita e della differenziazione delle cellule mieloidi e linfoidi⁶⁸; un recente studio ha inoltre messo in evidenza il ruolo chiave di tale fattore trascrizionale nell'induzione e nell'accumulo *in vitro* delle MDSC sia murine che umane⁶⁹.

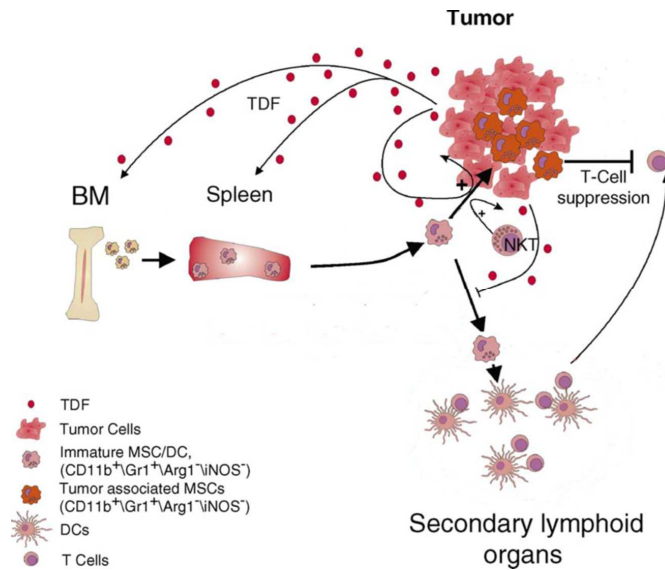


Figura 3

Reclutamento ed espansione di MDSC

La massa tumorale secerne diversi fattori solubili che inducono, nel midollo osseo, un aumento della mielopoiesi ed il blocco differenziativo delle cellule mieloidi. Le cellule mieloidi immature fuoriescono dal midollo osseo e si accumulano nella circolazione sistemica, nella massa tumorale e negli organi linfoidi secondari dove esercitano la loro funzione inibitoria nei confronti dei linfociti T. La figura è tratta da *Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression*, Serafini P. et al., Seminar in Cancer Biology, 2006.

Altre evidenze sperimentali suggeriscono che le MDSC possano essere indotte ed attivate da esosomi che vengono rilasciati dalle cellule tumorali, (TDEs = *tumor derived exosomes*)⁷⁰. Questi esosomi, caratterizzati dall'espressione superficiale di Hsp72, sembrano essere in grado di indurre la fosforilazione di STAT3 e quindi l'attivazione delle MDSC⁷¹. Alcuni TDEs possono inoltre esprimere il ligando Fas ed indurre l'apoptosi dei linfociti T CD8⁺. L'insieme di tutte queste osservazioni fanno ipotizzare un coinvolgimento di tali esosomi nei meccanismi di immunosoppressione⁷².

1.8.2 Le MDSC murine

Nel topo le MDSC sono caratterizzate dall'espressione dei marcatori Gr-1, CD11b e IL-4R α ⁷³. L'epitopo Gr-1 è espresso su due molecole, Ly6G e Ly6C, ed è presente sulla superficie di tutte le cellule mieloidi murine, a partire dalle cellule staminali⁷⁴. Recentemente, mediante l'utilizzo di anticorpi in grado di riconoscere queste due molecole, è stato possibile definire due sottopopolazioni di MDSC, una a fenotipo granulocitario (PMN-MDSC) e una a fenotipo monocitario (MO-MDSC). Le PMN-MDSC, caratterizzate da un alto *Side Scatter* (SSC) e dal fenotipo CD11b⁺/Gr-1^{high}/Ly6G⁺/Ly6C^{low/int}, producono alti livelli di ROS e bassi livelli di NO. Le MO-MDSC, caratterizzate da un SSC più basso, dal fenotipo CD11b⁺/Gr-1^{int}/Ly6G⁻/Ly6C^{high} e da livelli di espressione più alti di F4/80, CD115, 7/4 e CCR2, sembrano avere caratteristiche più infiammatorie, con una bassa produzione di ROS e elevati livelli di NO⁷⁵⁻⁷⁶.

Le due sottopopolazioni di MDSC sono state identificate anche nel microambiente tumorale e sono risultate essere per la maggior parte cellule a fenotipo CD11b⁺/Gr-1^{low}/F4/80⁺/IL4R α ⁺/CCR2⁺/CXCR1⁺ con caratteristiche di macrofagi M1 e M2⁷⁷⁻⁷⁸.

1.8.3 Le MDSC nei pazienti affetti da tumore

A differenza delle MDSC murine, il fenotipo delle MDSC umane non è ancora ben definito. La mancanza, infatti, di un omologo umano del Gr-1 murino ha ostacolato l'identificazione dei marcatori delle MDSC umane. Nonostante questo, molti studi effettuati su pazienti affetti da tumore hanno permesso di identificare, così come nel topo, due sottopopolazioni di MDSC, una granulocitaria ed una monocitaria, caratterizzate dall'espressione di determinati marcatori.

Uno dei primi studi che hanno indagato la presenza delle MDSC umane è stato condotto in pazienti affetti da carcinoma squamoso della testa e del collo (SCCHN), del polmone o del seno⁷⁹. Analizzando i PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) isolati dai pazienti, Gabrilovich e colleghi hanno dimostrato la presenza di una popolazione cellulare immatura, costituita da precursori mieloidi, monociti immaturi e cellule dendritiche immature, con fenotipo Lin⁻/HLA-DR⁻/CD33⁺/CD15⁻ e in grado di inibire la proliferazione linfocitaria. Successivamente studi condotti dal gruppo di

Ochoa su pazienti affetti da carcinoma renale, hanno evidenziato, all'interno della popolazione cellulare mononucleata, l'espansione di cellule con fenotipo e morfologia tipiche dei granulociti. Gli autori hanno inoltre dimostrato che questa popolazione cellulare, definita come $CD11b^+/CD14^-/CD15^+$, è in grado di sopprimere la proliferazione linfocitaria inducendo anche la diminuzione dell'espressione della catena ζ del complesso recettoriale del CD3 e la diminuzione dell'IFN- γ prodotto dai linfociti T attivati⁸⁰. Recentemente, analizzando l'espressione del CD66b, marcatore dei granuli secondari delle cellule mieloidi⁸¹⁻⁸², lo stesso gruppo di ricerca ha definito queste cellule come granulociti attivati esprimenti anche il VEGFR1 (recettore di tipo 1 del VEGF) ed in grado di rilasciare, nel plasma, l'arginasi I (Arg-I) contenuta nei granuli citoplasmatici⁸³. L'espansione di una popolazione con caratteristiche morfologiche simili è stata inoltre riscontrata in PBMC isolati da sangue periferico di pazienti affetti da SCCHN o da carcinoma della vescica o dell'uretere⁸⁴. Utilizzando i marcatori CD16 e CD11b, utili per definire lo stadio maturativo dei precursori granulocitari, Lang e colleghi hanno identificato MDSC $SSC^{high}/CD66b^+$ comprendenti tre diverse sottopopolazioni cellulari ($CD16^+/CD11b^+$, $CD16^-/CD11b^-$ e $CD16^-/CD11b^+$) evidenziando la presenza di precursori granulocitari in diversi stadi di maturazione⁸⁴.

In contrasto con queste osservazioni, uno studio effettuato su pazienti affetti da melanoma metastatico ha evidenziato un'espansione di cellule ad attività soppressoria con caratteristiche simili a monociti definite come $CD14^+/CD11b^+/HLA-DR^{low/-}$ ed in grado di secernere il TGF- β ⁸⁵. MDSC umane con fenotipo simile sono state evidenziate anche in PBMC isolati da sangue periferico di pazienti affetti da carcinoma prostatico⁸⁶. Studi condotti su pazienti affetti da mieloma multiplo e carcinoma squamoso della testa e del collo hanno inoltre evidenziato la suscettibilità delle MDSC, definite come $CD14^+/Arg-I^+$, all'azione degli inibitori della fosfodiesterasi 5⁸⁷. A supporto di queste evidenze uno studio condotto da Hoechst e colleghi ha dimostrato l'espansione di MDSC con caratteristiche monocitarie nel sangue periferico e nella massa tumorale di pazienti affetti da carcinoma epatocellulare. Inoltre è stato dimostrato che queste cellule, definite come $CD14^+/HLA-DR^-$ e caratterizzate da un'alta attività arginasi, sono in grado di indurre l'espansione delle Treg⁸⁸.

Recentemente il nostro gruppo ha identificato nel sangue di pazienti affetti da melanoma e carcinoma del colon l'espansione di cellule dotate di attività

soppressoria sia nel compartimento monocitario (CD14⁺) che in quello granulocitario (CD15⁺). Tali cellule sono caratterizzate da un'elevata espressione di IL4R α che è già stato dimostrato essere un marcatore utile per l'identificazione delle MDSC murine ⁷³; l'espansione di cellule IL4R α ⁺ risulta però correlare con l'attività soppressoria solo nelle cellule CD14⁺ ⁸⁹.

Infine, alcuni studi hanno evidenziato la possibilità di identificare le MDSC anche attraverso la loro negatività per marcatori specifici di cellule mature, quali linfociti T, B e NK, monociti e granulociti maturi, che appartengono ad un diverso *lineage* cellulare (Lin) ^{79,90-91}. Uno studio effettuato in pazienti affetti da carcinoma renale ha dimostrato, infatti, che le MDSC possono essere isolate dalla frazione circolante Lin⁻/HLA-DR⁻; questa popolazione contiene cellule mieloidi CD33⁺ appartenenti sia al compartimento monocitario che a quello granulocitario ⁹⁰. Un recente studio ha inoltre evidenziato l'espansione di MDSC con caratteristiche fenotipiche simili nel sangue di pazienti affetti da tumori solidi; è stato anche dimostrato che l'accumulo delle MDSC Lin^{low/-}/HLA-DR⁻/CD11b⁺/CD33⁺ correla con la progressione della malattia ⁹¹. In pazienti affetti da carcinoma polmonare, è stata anche definita una popolazione di MDSC definita come CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺/CD33⁺ in grado di ridurre l'espressione della catena ζ del CD3 su linfociti T CD8⁺ ⁹². In un recente studio condotto in pazienti affetti da carcinoma renale o da sarcoma, è stato messo in evidenza che sia la frazione Lin⁻/HLA-DR⁻/CD33⁺ che la frazione CD14⁻/CD11b⁺/CD33⁺ sono in grado di sopprimere la proliferazione linfocitaria, anche se la seconda popolazione si è dimostrata essere la più soppressoria ⁹³.

Nonostante siano stati identificati dei marcatori in grado di discriminare la presenza di MDSC in pazienti affetti da tumore, non è ancora chiaro se il diverso fenotipo delle MDSC riscontrato dai diversi gruppi di ricerca dipende dal tipo di tumore considerato. Per questo motivo sarebbe necessario identificare un marcatore specifico delle MDSC umane, da aggiungere agli altri marcatori mieloidi comunemente utilizzati.

1.8.4 MDSC e immunosoppressione

Diversi ricercatori hanno ipotizzato che le MDSC, per esercitare la loro azione immunosoppressoria, richiedano non solo l'azione di alcuni mediatori necessari per la loro espansione, ma anche l'intervento di fattori che ne inducano l'attivazione. Alcuni studi hanno messo in evidenza che alcuni segnali necessari per l'attivazione delle MDSC possono derivare da fattori solubili rilasciati da linfociti T attivati e da cellule stromali ⁹⁴, quali l'IFN- γ , i ligandi per i *tool-like receptors* (TLRs), l'IL-4, l'IL-13 e il TGF- β . Questi fattori attivano, all'interno delle MDSC, diverse vie di trasduzione del segnale che coinvolgono l'attivazione dei fattori trascrizionali STAT1, STAT3, STAT6 e NF- κ B ^{49,75,94-99}.

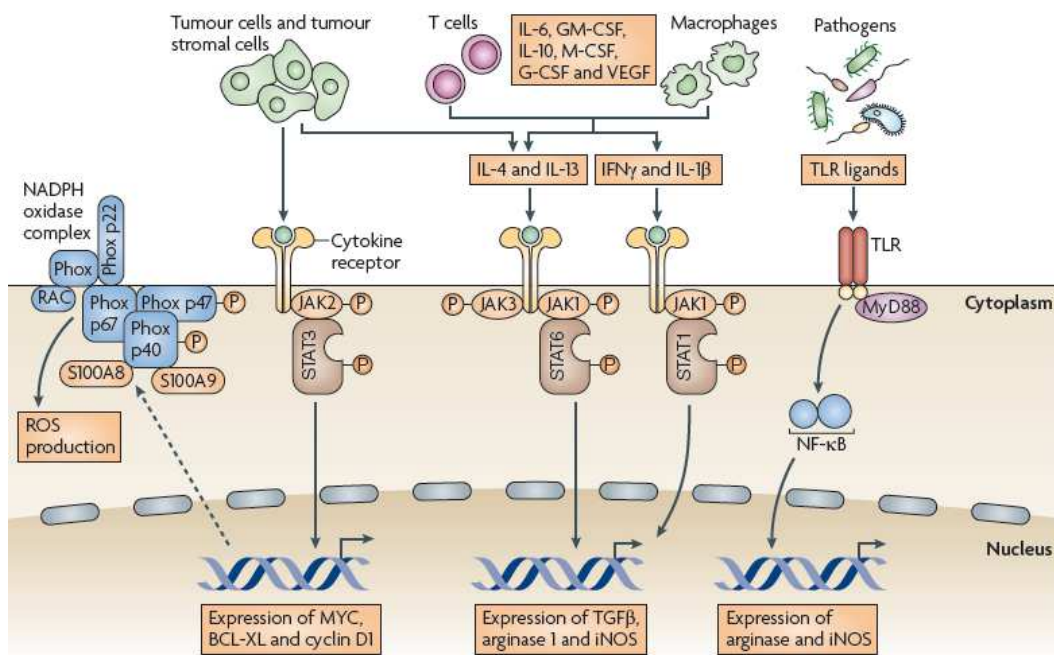


Figura 4

Segnali e vie di trasduzione coinvolti nell'attivazione delle MDSC

L'accumulo delle MDSC è indotto da diversi fattori rilasciati dalla massa tumorale, dalle cellule stromali, da linfociti T o macrofagi attivati, da cellule tumorali apoptotiche o da agenti patogeni. Questi fattori inducono l'attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale che coinvolgono principalmente i fattori trascrizionali STAT1, STAT3, STAT6 e NF- κ B che inducono l'attivazione degli enzimi immunosoppressori Arg-I e iNOS e la produzione di TGF- β e di ROS. La figura è tratta da *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*, Gabrilovich D.I. and Nagaraj S., Nature, 2009.

Il rilascio di IFN- γ , IL-4 e IL-13 gioca un ruolo chiave nell'attivazione delle MDSC. Il segnale mediato da tali fattori contribuisce all'attivazione di due enzimi chiave, iNOS e Arg-I, che sono spesso associati all'immunosoppressione mediata dalle MDSC^{75-76,100-102}. Sia iNOS che Arg-I sono associati al metabolismo dell'L-arginina, un amminoacido essenziale per l'attivazione e la proliferazione linfocitaria. La rimozione dell'L-arginina dal microambiente inibisce la proliferazione linfocitaria attraverso molteplici meccanismi tra i quali la riduzione dell'espressione della catena ζ del complesso recettoriale CD3 necessaria per la trasduzione del segnale all'interno dei linfociti T^{92,102-104}. L'attivazione di Arg-I e iNOS, inoltre, induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno e perossinitriti che, inducendo l'apoptosi e la nitratura dei linfociti T, li rendono incapaci di riconoscere e legare le molecole MHC presentanti l'antigene¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Recentemente è stato ipotizzato che le MDSC, per esplicitare la loro azione soppressoria, utilizzino il metabolismo della cisteina, un altro amminoacido essenziale per l'attivazione, la proliferazione ed il differenziamento dei linfociti T¹⁰⁸. Normalmente i linfociti T importano la cisteina rilasciata dalle cellule dendritiche e dai macrofagi durante il processo di presentazione dell'antigene. Le MDSC, come i linfociti T, non contengono l'enzima necessario per produrre in modo autocrino la cisteina e, quindi, sono costrette a importare anch'esse la cisteina rilasciata nel microambiente sottraendola così ai linfociti T che conseguentemente entrano in uno stato di anergia¹⁰⁹.

Studi recenti hanno inoltre messo in evidenza la capacità delle MDSC di impedire l'*homing* dei linfociti T attraverso la riduzione dell'espressione dell'L-selectina (CD62L), una molecola che facilita la fuoriuscita dei linfociti T *naive* dalla circolazione sistemica ed il successivo raggiungimento dei linfonodi o dei siti di infiammazione¹¹⁰.

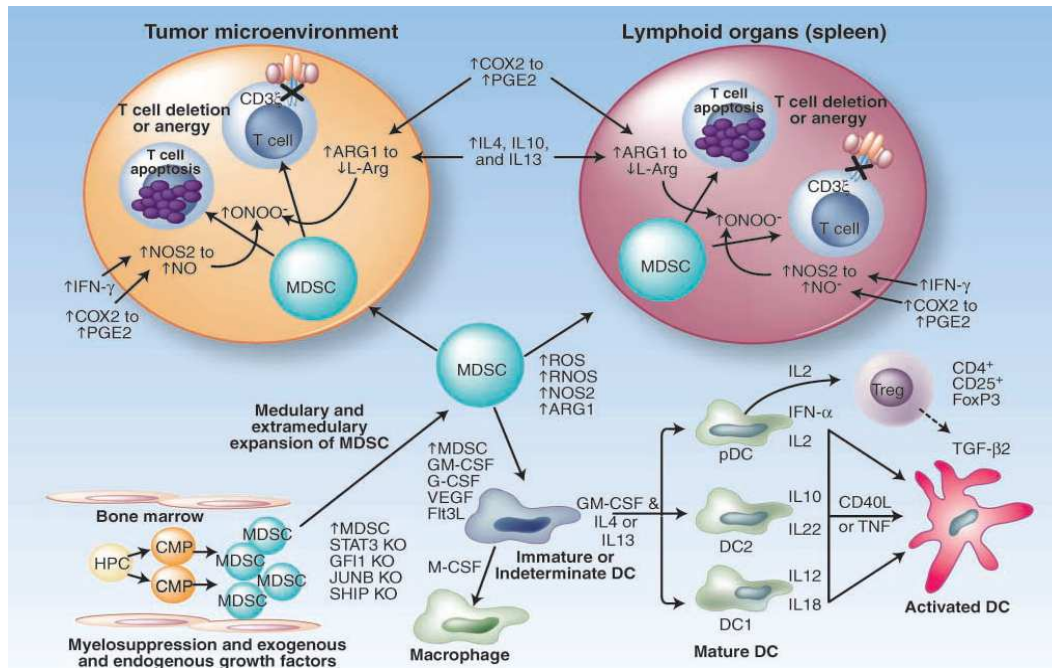


Figura 5

Meccanismi di espansione ed attivazione delle MDSC

In condizioni di emopoiesi “steady state” le cellule progenitrici ematopoietiche (HSC) proliferano nel midollo osseo dove differenziano nei diversi *lineage* cellulari tra i quali quello mieloide. Le cellule tumorali, rilasciando diversi fattori solubili, sono in grado di indurre un incremento della mielopoiesi con conseguente fuoriuscita dal midollo osseo di cellule mieloidi immature. Queste cellule immature si accumulano nella circolazione sistemica, negli organi linfoidi secondari e nella massa tumorale dove esercitano una funzione immunosoppressoria nei confronti dei linfociti T. L’immunosoppressione esercitata dalle MDSC è mediata attraverso l’azione degli enzimi Arg-I e iNOS che rimuovono l’L-arginina dal microambiente impedendo così ai linfociti T di attivarsi e di sviluppare una adeguata risposta antitumorale. L’attività di Arg-I induce la diminuzione dell’espressione della catena ζ del complesso recettoriale CD3 mentre l’attività di iNOS induce la nitrosilazione dei recettori dei linfociti T che entrano in uno stato di anergia. L’aumentata espressione di entrambi gli enzimi induce anche l’incremento della produzione di ROS e dei perossinitriti che inducono apoptosi dei linfociti T. La figura è tratta da *Pathways mediating the expansion and immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells and their relevance to cancer therapy*, Talmadge J.E., Molecular Pathways, 2007.

1.8.5 MDSC e progressione tumorale

Crescenti evidenze suggeriscono il coinvolgimento delle MDSC nell'induzione dell'angiogenesi e nella progressione tumorale, sia nel modello murino che in pazienti affetti da tumore ¹¹¹. Le MDSC infiltranti il tumore sembrano infatti essere in grado di acquisire un fenotipo endoteliale che permette loro di incorporarsi nell'endotelio tumorale dove, in collaborazione con i progenitori delle cellule endoteliali, contribuiscono alla formazione di nuovi vasi ¹¹².

Sono state avanzate due ipotesi per spiegare i meccanismi attraverso i quali le MDSC promuovono l'invasione tumorale e lo sviluppo di metastasi. Il primo meccanismo proposto suggerisce che le MDSC facilitino la progressione tumorale attraverso il rilascio di fattori pro-angiogenetici, quali il VEGF ed il bFGF (*basic fibroblast growth factor*), e la produzione di metalloproteasi che agiscono in modo da creare un microambiente favorevole alla crescita tumorale ¹¹²⁻¹¹⁶. Il secondo meccanismo proposto si basa sull'ipotesi che le MDSC siano in grado di promuovere lo sviluppo di metastasi fondendosi con le cellule tumorali ¹¹⁷⁻¹¹⁸.

1.8.6 MDSC come possibile bersaglio terapeutico

Il successo degli approcci immunoterapici per la cura del cancro non dipende solo dalla capacità di presentazione dell'antigene da parte delle cellule APC o di sviluppare un'adeguata risposta immunitaria da parte dei linfociti T. Negli ultimi anni è risultato evidente che l'immunosoppressione associata ai tumori non solo facilita la progressione tumorale ma è anche uno dei fattori principali che limitano l'efficacia dell'immunoterapia. Si è quindi diffusa la convinzione che l'immunoterapia possa risultare efficace nell'eradicazione del tumore solo se associata a strategie terapeutiche in grado di bloccare i meccanismi di immunosoppressione ¹¹⁹.

Le MDSC sono considerate, insieme alle Treg, uno dei principali mediatori dell'immunosoppressione associati ai tumori o ad altre condizioni patologiche. Per questo motivo molti gruppi di ricerca stanno attualmente valutando le possibili strategie terapeutiche per eliminare le MDSC in pazienti affetti da tumore. I diversi approcci terapeutici testati comprendono l'utilizzo di agenti in grado di indurre la differenziazione delle MDSC, quali l'acido *all-trans* retinoico (ATRA) ¹²⁰, la

chemioterapia ¹²¹, gli inibitori delle tirosin chinasi quali il *sunitinib* ¹²²⁻¹²⁴, , gli inibitori della COX2 ^{58,125-126} e gli inibitori della fosfodiesterasi 5 (PDE5) ⁸⁷, come il *sildenafil*. Tutti questi composti hanno dato buoni risultati nei test preclinici ed alcuni di essi sono già stati testati in clinica ¹¹⁹.

Uno di più promettenti approcci terapeutici che ha come bersaglio le MDSC prevede l'utilizzo di agenti in grado di promuovere la differenziazione delle cellule mieloidi. All'interno di questa categoria di agenti l'ATRA e la vitamina D3 sono risultate essere efficaci nell'indurre la differenziazione delle MDSC umane e murine in cellule dendritiche e macrofagi sia *in vitro* che *in vivo* ^{63,119-120}.

Un altro approccio terapeutico consiste nel bloccare l'induzione delle MDSC a partire dai precursori mieloidi. A questo scopo sono stati testati inibitori dell'SCF, inibitori delle tirosin chinasi e inibitori del VEGF. Partendo dalla considerazione che le MDSC sono indotte da fattori solubili rilasciati dal tumore, molti gruppi di ricerca si sono focalizzati sulla neutralizzazione di tali fattori. Recentemente è stato osservato che l'inibizione del legame dell'SCF al suo recettore (c-kit, CD117) induce la riduzione dell'angiogenesi e delle MDSC ⁵⁷. Numerosi studi hanno inoltre messo in evidenza il ruolo chiave del fattore trascrizionale STAT3 nella biologia delle MDSC. Alterazioni nel microambiente tumorale, come l'attivazione dei recettori associati alle tirosin chinasi e il rilascio di IL-6, VEGF e IL-10, inducono l'espressione costitutiva di STAT3 all'interno delle MDSC ¹²⁷⁻¹²⁸. Il *sunitinib*, una molecola in grado di agire come inibitore delle tirosin chinasi, del VEGF, del PDGFR (*platelet-derived growth factor*), c-kit, FLT3, CSF-1 (*colony-stimulator factor 1*) e RET, si è dimostrata in grado di inibire l'accumulo delle MDSC e di ripristinare la risposta immunitaria sia nel modello murino ¹²³ che in pazienti affetti da carcinoma renale ^{122,124}. Un altro possibile bersaglio terapeutico per la regolazione delle MDSC potrebbe essere il VEGF che sembra essere coinvolto nell'accumulo delle MDSC ¹¹²; l'utilizzo di un inibitore del VEGF, il *bevacizumab*, ha infatti determinato la riduzione delle MDSC nella circolazione sistemica di pazienti affetti da carcinoma renale metastatico ⁹⁰ anche se risultati contrastanti sono stati ottenuti da un altro studio condotto da Rodriguez su pazienti affetti dallo stesso tipo di tumore ⁸³.

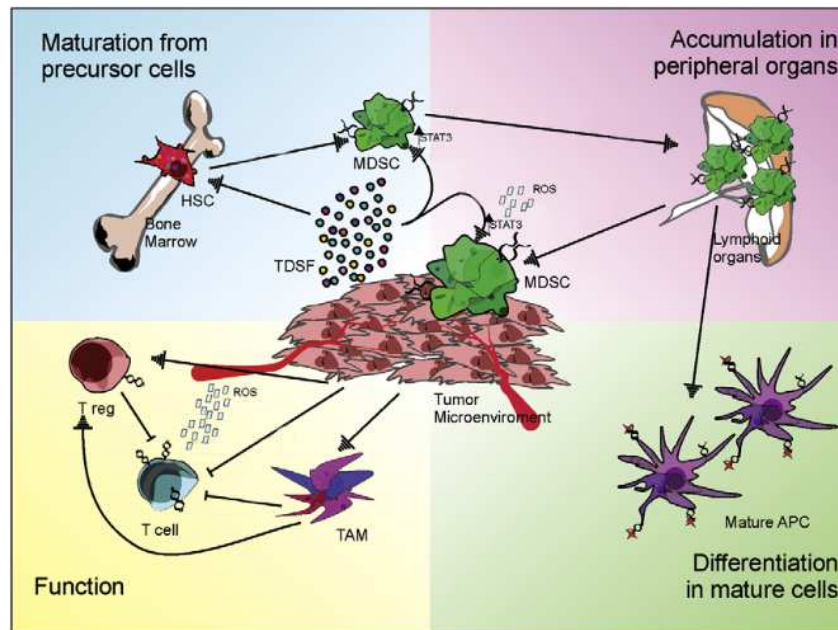


Figura 6

Strategie terapeutiche per l'eradicazione delle MDSC

I possibili inibitori delle MDSC si possono suddividere, a seconda dell'azione da loro svolta, in quattro classi. Le quattro categorie, rappresentate da quattro colori diversi, includono inibitori che inducono la maturazione delle MDSC a partire dai precursori mieloidi (area blu); inibitori che riducono l'accumulo delle MDSC negli organi periferici (area viola); inibitori che inducono la maturazione delle MDSC in cellule mature (area verde); inibitori dei meccanismi di immunosoppressione utilizzati dalle MDSC (area gialla). La figura è tratta da *Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells*, Current Opinion in Pharmacology, Ugel S. et al., 2009.

Allo scopo di inibire la funzionalità delle MDSC, i ricercatori hanno inoltre considerato, come possibili bersagli terapeutici, i meccanismi attraverso i quali le MDSC esercitano la loro azione immunosoppressoria. Uno di questi potenziali bersagli terapeutici è l'enzima COX2, necessario per la produzione della prostaglandina E2 coinvolta nell'induzione di Arg-I e, quindi, nell'induzione dell'attività soppressoria delle MDSC^{58,125}. L'utilizzo del *colecixib*, un inibitore della COX2, ha permesso di ridurre l'espressione di Arg-I nelle MDSC, di migliorare la risposta linfocitaria antitumorale e di rafforzare l'efficacia delle terapie immunoterapiche^{80,126}. L'espressione di Arg-I è ridotta anche dall'azione del *sildenafil*, un inibitore della PDE5, utilizzato correntemente nella pratica clinica di patologie non maligne. In pazienti affetti da mieloma multiplo e carcinoma della testa e del collo, l'utilizzo di tale inibitore è risultato in grado di indurre anche la

diminuzione dell'espressione di iNOS inibendo così la capacità immunosoppressoria delle MDSC ⁸⁷. L'attività di Arg-I e di iNOS è inoltre diminuita dall'azione della nitroaspirina; in un modello murino di carcinoma del colon è stato infatti dimostrato che tale composto inibisce la produzione dei ROS e favorisce lo sviluppo di una risposta linfocitaria tumore-specifica ¹²⁹.

Un ultimo approccio terapeutico dimostratosi utile per l'eradicazione delle MDSC è basato sull'utilizzo di agenti chemioterapici. La somministrazione di *gemcitabina*, per esempio, è in grado di ridurre le MDSC in topi portatori di tumore ed ha incrementato l'efficacia del protocollo immunoterapico testato ^{51,121}. Un recente studio condotto sul modello murino ha inoltre evidenziato che la somministrazione del *5-fluorouracile* (5-FU) è in grado di ridurre la presenza delle MDSC sia nella milza che nella massa tumorale ¹³⁰. In contrasto con queste osservazioni, è stato recentemente evidenziato che l'uso combinato della *doxorubicina* e della *ciclofosfamida* induce un aumento delle MDSC nel sangue di pazienti affetti da tumore al seno ⁹¹.

2. SCOPO DELLA TESI

Il tumore è in grado di evadere il riconoscimento da parte del sistema immunitario inducendo l'espansione di una serie di popolazioni cellulari deputate al mantenimento della tolleranza immunitaria. Una di queste popolazioni è rappresentata dalle MDSC, le cui caratteristiche salienti sono l'immatùrità e l'eterogeneità. Si pensa che il meccanismo attraverso cui il tumore recluta tali cellule sia il rilascio di diversi fattori solubili con il conseguente aumento della mielopoiesi ed il blocco maturativo delle cellule mieloidi. Queste cellule immature fuoriescono poi dal midollo osseo per accumularsi nel sito tumorale, negli organi linfoidi secondari e nella circolazione sistemica dove esercitano un'attività soppressoria nei confronti dei linfociti T impedendo, quindi, lo sviluppo di un'efficace risposta antitumorale.

Per poter indagare alcuni aspetti importanti della biologia delle MDSC umane, abbiamo messo a punto un sistema di induzione *in vitro* delle MDSC a partire da sangue midollare. Le cellule così ottenute sono state utilizzate per definirne le caratteristiche fenotipiche e per analizzare i meccanismi mediante i quali queste cellule sono in grado di esercitare la loro azione soppressoria nei confronti dei linfociti T attivati. Inoltre, mediante esperimenti di *sorting* cellulare, abbiamo potuto identificare con precisione la sottopopolazione delle BM-MDSC responsabile della soppressione della proliferazione linfocitaria. Analizzando la morfologia delle cellule appartenenti a questa sottopopolazione abbiamo potuto definirne il preciso stadio di differenziazione, evidenziando anche le caratteristiche che le distinguono dalle cellule isolate da midollo *ex-vivo*.

Infine, abbiamo studiato la possibilità di eliminare selettivamente questa popolazione soppressoria mediante l'utilizzo di farmaci. A questo scopo abbiamo valutato l'effetto del 5-FU sull'induzione e sulla capacità soppressoria delle BM-MDSC.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni biologici di aspirato midollare

I campioni di sangue midollare utilizzati in questo studio provengono dal Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica dell'Università di Padova e sono stati prelevati da pazienti con sospetto di leucemie o linfomi, da pazienti con leucemie linfatiche dopo il settantottesimo giorno in assenza di recidive o re-induzioni e da pazienti con leucemie linfatiche in post trapianto di midollo osseo (TMO, *Bone Marrow Transplantation*). Per questo studio sono stati utilizzati solamente i citoaspirati che presentavano caratteristiche citologiche nei limiti di normalità. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti gli individui partecipanti allo studio e lo studio è stato approvato da una commissione etica.

3.2 Trattamento *in vitro* di cellule di aspirato midollare con l'aggiunta di fattori di crescita

Il sangue midollare è stato sottoposto alla lisi degli eritroblasti e dei globuli rossi per cinque minuti a temperatura ambiente utilizzando una soluzione ipotonica di 15.4 mM NH₄Cl (Sigma-Aldrich), 0.1 mM KHCO₃ (Analytical Carlo Erba), 0.01 mM EDTA (Sigma-Aldrich). Dopo un lavaggio, le cellule sono state risospese in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco) addizionato di 10% di FBS, hepes, penicillina/streptomocina e β-mercaptoetanolo (Sigma-Aldrich).

Le cellule così ottenute sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti (Falcon, BD) alla concentrazione di 1x10⁶ cellule/ml ed incubate per 4 giorni in incubatore a 37°C e all'8% di CO₂ in presenza delle combinazioni dei seguenti fattori di crescita: 40 ng/ml G-CSF ricombinante umano (rhG-CSF, Lenograstim, Sanofi Aventis), 40 ng/ml GM-CSF ricombinante umano (rhGM-CSF, Leucomax, Novartis Farma SpA), 40 ng/ml IL-6 ricombinante umana (rhIL-6, PeproTech Inc.). Una parte delle cellule è stata mantenuta in coltura, come controllo, senza l'aggiunta dei fattori di crescita. È stato inoltre valutato l'effetto dell'aggiunta di diverse dosi di 5-FU (0.03, 0.27 e 2.43 µg/ml) alle colture delle cellule midollari depletate dei linfociti T mediante l'utilizzo

di biglie immunomagnetiche CD3; il farmaco è stato gentilmente fornito dall'Istituto Oncologico Veneto di Padova.

3.3 Analisi citofluorimetrica delle cellule di midollo

Le cellule di midollo sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica prima e dopo coltura con i fattori di crescita, mediante marcature con i seguenti anticorpi monoclonali: CD-14-PE, CD39-APC, CD-73-PE, CD33-FITC e APC, CD34-PE, Lin cocktail 1-FITC (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), CD66b-FITC, CD8-PeCy5, CD11b-PeCy5, CD15-FITC e Ki-67-Alexa Fluor 488 (BD Biosciences); IgG1-Alexa Fluor 488 (Invitrogen); IFN- γ -APC, IgG1-APC, CD14-APC, CD16-FITC, HLA-DR-FITC, HLA-DR PerCp-Cy5.5, B7-H2-PE e B7-H3-PE (BioLegend); B7-H1-PE (eBiosciences) CD11b-PE, CD3-PC7, CD16-FITC e CD3 ζ -PE (Beckman Coulter); CD3-APC (Immunotools); CD13-FITC (Santa Cruz Biotechnology Inc.); IL4R α -PE (CD124) IgG2a-PE e IgG1-PE (R&D Systems); CD8-PerCp, CD62L-FITC e CD117-PE (Miltenyi Biotec). Le cellule sono state lavate con HCF, saturate con l'*FcR blocking reagent* (Miltenyi Biotec) per 15 minuti a 4°C e successivamente marcate per 30 minuti a 4°C. L'analisi della vitalità cellulare è stata effettuata mediante citometria a flusso marcando le cellule con annessina V-Alexa 647 (BioLegend) in combinazione con la 7AAD (7-Aminoactinomicina D, BD Biosciences).

Le analisi della produzione di IFN- γ e dell'espressione del CD3 ζ sono state effettuate mediante marcature intracitoplasmatiche. Per la determinazione della produzione di IFN- γ , le cellule sono state incubate 5 ore con 10 μ g/ml di Brefeldina A (Sigma Aldrich) a 37°C al 5% di CO₂, in modo da bloccare il rilascio della citochina che viene così trattenuta nel citoplasma. Le cellule sono state lavate e marcate con gli anticorpi diretti contro gli antigeni di superficie per poi essere fissate e permeabilizzate mediante incubazione con la soluzione *Cytofix/Cytoperm*TM (BD Biosciences) per 20 minuti a 4°C. Le cellule sono state lavate due volte con PBS 0.5% di BSA (Sigma Aldrich) e 0.1% di saponina (Sigma Aldrich) e incubate per 30 minuti con gli anticorpi anti-IFN- γ e anti-CD3 ζ . Le cellule sono state lavate ed il pellet è poi stato poi risospeso in 250 μ l di HCF. I campioni marcati sono stati acquisiti al FACSCalibur e l'analisi è stata effettuata utilizzando il *software* FlowJo

(Tree Star Inc.). L'analisi è stata condotta prendendo in esame le cellule CFSE⁺ ed analizzando la percentuale di cellule CD3⁺IFN- γ ⁺ o l'intensità di fluorescenza del CD3 ζ nella popolazione CD3⁺/CD8⁺.

3.4 Saggi di proliferazione

Per testare l'attività soppressoria delle cellule midollari sono state allestite delle colture linfocitarie miste (MLR: *mixed leukocyte reaction*) o dei saggi di proliferazione con anti-CD3/CD28. PBMC di donatori sani sono stati scongelati, lavati e risospesi in PBS ad una concentrazione di 2×10^7 cellule/ml ed incubati con il CFSE (Invitrogen, Molecular Probes) ad una concentrazione finale di 2-4 μ M per 5 minuti at 37°C. Le cellule sono state lavate, risospese nel terreno di coltura e stimulate per 4 giorni con anti-CD3 (1 μ g/ml) e anti-CD28 (5 μ g/ml, BioLegend) o per 7 giorni con un pool di PBMC *stimulator γ -irradiati* (provenienti da tre donatori sani) in rapporto 1:1. Alla coltura sono poi state aggiunte: i) le cellule di midollo trattate o meno con le citochine; ii) le frazioni isolate da midollo *ex-vivo* o da midollo trattato con le citochine mediante *sorting* immunomagnetico o mediante *FACS sorting*, iii) le cellule di midollo trattate con le citochine in presenza di diverse dosi di 5-FU. I saggi di proliferazione con anti-CD3/CD28 sono stati condotti in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto, mentre le MLR sono state allestite in piastre da 96 pozzetti a fondo a U (Falcon, BD). Tutte le colture sono state incubate a 37°C e al 5% di CO₂ in RPMI privo di arginina (Biological Industries) e addizionato di 150 μ M di arginina e 10% FBS (BioWhittaker), penicillina/streptomina e hepes (BioWhittaker). Dopo rispettivamente 4 o 7 giorni di coltura, le cellule sono state raccolte e marcate con l'anticorpo anti-CD3-APC. La valutazione della proliferazione è stata effettuata mediante analisi del decadimento della fluorescenza del CFSE analizzata nel gate CD3⁺. L'analisi della proliferazione cellulare, effettuata mediante l'utilizzo del *software* FlowJo (Tree Star, Inc.), è stata quantificata mediante l'utilizzo di diverse metodiche, in quanto abbiamo notato che il fenomeno della soppressione si può manifestare sia come riduzione del numero di generazioni proliferanti che come riduzione del numero assoluto di linfociti T proliferanti. La proliferazione cellulare è stata quindi valutata:

- calcolando la percentuale di cellule CFSE⁺/CD3⁺ appartenenti alla prima e alla seconda generazione e, ponendo il valore percentuale riferito al controllo di

proliferazione dei soli PBMC uguale a 100, è stata calcolata la percentuale della proliferazione dei PBMC in presenza delle cellule di midollo;

- considerando, nel *gate* $CFSE^+/CD3^+$, il numero assoluto di eventi della generazione parentale (linfociti T *resting*) e quello relativo alle generazioni di linfociti T proliferanti;
- considerando la percentuale di cellule $CD3^+CFSE^+$ e rapportando poi al 100% il controllo di proliferazione.

3.5 Marcatura delle cellule di midollo con CFSE

Le cellule di midollo sono state emolizzate e depletate dei linfociti T attraverso separazione immunomagnetica utilizzando le microbiglie CD3. Le cellule $CD3^-$ così ottenute sono state marcate con CFSE 2 μM , piastrate in piastre da 24 pozzetti alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml e coltivate *in vitro* per 4 giorni con la combinazione di G-CSF+GM-CSF, secondo quanto descritto nella sezione 3.2. La marcatura delle cellule di midollo con CFSE è stata ottimizzata in modo da scartare le concentrazioni tossiche del colorante. E' stata quindi effettuata una cinetica della proliferazione delle cellule mieloidi in risposta al trattamento con G-CSF+GM-CSF marcando le cellule, ad ogni giorno della coltura, con gli anticorpi anti-CD11b e anti-CD16 ed analizzando il profilo del CFSE. La proliferazione cellulare è stata poi quantificata utilizzando il *software* FlowJo (Tree Star Inc.).

3.6 Separazione immunomagnetica della frazione $CD16^-/CD11b^{low/-}$ dal midollo *ex-vivo* e dalle BM-MDSC

Le frazioni $CD16^-/CD11b^{low/-}$, $CD16^-/CD11b^+$ e $CD16^+/CD11b^+$, sono state isolate dal midollo *ex-vivo* e dal midollo coltivato *in vitro* in presenza di G-CSF+GM-CSF mediante *FACS sorting* effettuato presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova. Le cellule sono state prima marcate con gli anticorpi monoclonali anti-CD11b, anti-CD16 e anti-CD3 e poi separate mediante il *FACS sorter* MoFlo (DakoCytomation, Fort Collins, CO). La separazione è stata effettuata escludendo la popolazione linfocitaria sulla base dei parametri morfologici di FSC (*Forward Scatter*) e SSC e sulla base della positività per il CD3. Tutte le frazioni sono state ottenute con una purezza di almeno il 90%.

La stessa frazione CD16⁻/CD11b^{low/-} è stata isolata anche attraverso due diverse separazioni immunomagnetiche. Nella prima separazione immunomagnetica le BM-MDSC, già depletate *ex-vivo* dei linfociti CD3⁺/CD19⁺/CD56⁺ mediante un *cocktail* di biglie immunomagnetiche CD3, CD19 e CD56 (Miltenyi Biotec), sono state depletate delle cellule CD11b⁺ utilizzando delle biglie immunomagnetiche CD11b (Miltenyi Biotec). Nella seconda separazione immunomagnetica le BM-MDSC sono invece state depletate delle cellule Lin⁺ (CD2⁺, CD3⁺, CD11b⁺, CD14⁺, CD15⁺, CD16⁺, CD19⁺, CD56⁺, CD123⁺ e CD235a⁺) mediante l'utilizzo delle biglie immunomagnetiche Lin (Miltenyi Biotec). Le separazioni cellulari sono state effettuate seguendo le indicazioni fornite dalla ditta; la purezza e la vitalità delle frazioni isolate in tutti gli esperimenti condotti è risultata maggiore del 95%.

3.7 ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

I surnatanti delle colture delle cellule midollari e dei saggi funzionali sono stati raccolti e centrifugati a 450g per 6 minuti a 4°C per rimuovere eventuali cellule presenti in sospensione. Il surnatante è stato subito congelato in azoto liquido e poi trasferito a -80°C. I surnatanti raccolti sono poi stati testati in ELISA per determinare, seguendo le indicazioni fornite dalla ditta, la presenza di IL-6 o IFN- γ (Diaclone).

3.8 Produzione dell'anticorpo monoclonale specifico per Arginasi I umana e coniugazione dello stesso con il fluorocromo Alexa Fluor 488

Il peptide specifico con la sequenza C-terminale di Arginasi I (CFGLAREGNHKPIDYLNPPK), è stato sintetizzato e coniugato alla proteina *carrier* Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). Tre topi BALB/c sono stati immunizzati mediante iniezioni sottocutanee ripetute di peptide coniugato, mescolato con l'adiuvante completo di Freund (CFA). Dopo il terzo inoculo, è stato prelevato un piccolo campione di sangue, ed il siero è stato analizzato per la reattività contro il peptide non coniugato, tramite un test ELISA. Il topo con il più alto titolo anticorpale è stato quindi sacrificato, e ne è stata prelevata la milza. Per ottenere gli ibridomi richiesti, i linfociti B isolati dalla milza sono stati fusi con cellule della linea di mieloma NS0, derivante dalla linea cellulare MOPC-21, un plasmocitoma indotto da

olio minerale in topi femmina BALB/c. Per la fusione della linea NS0 con le cellule B presenti nella milza, sono stati mescolati insieme 100×10^6 splenociti e 20×10^6 cellule NS0 in 25 ml di RPMI 1640 (Life Technologies) preriscaldato a 37°C . Le cellule sono state centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente e sono poi state mantenute per 7 minuti in bagnetto termico a 37°C in presenza di 1 ml di Polyethylenglicole (PEG-1500, 50% p/v, Sigma-Aldrich) preventivamente riscaldato. Dopo uno “*spin down*” a temperatura ambiente, il surnatante è stato eliminato ed il pellet è stato risospeso in RPMI 1640 addizionato con 15% di FBS (Gibco, Invitrogen), 2 mM di L-Glutamina (Cambrex), 1 mM di Sodio-Piruvato (Cambrex), 200 U/ml Penicillina-Streptamicina (Cambrex), $0.5 \times 10^{-5}\text{M}$ β -mercaptoetanololo (Sigma Aldrich) e Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine (HAT 1x, Sigma Aldrich). Le cellule ibride sono poi state distribuite in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto (Falcon, BD), mantenute in incubatore a 37°C al 5% di CO_2 e clonate mediante la tecnica della diluizione limitante. I surnatanti delle colture cellulari sono stati testati per la reattività ad Arg-I mediante western blot, citometria a flusso ed immunocistochemica su sezioni paraffinate di tessuto epatico. Il clone 1.10 è stato selezionato per la sua migliore specificità e successivamente è stato coniugato con il fluorocromo Alexa Fluor 488 utilizzando l’Alexa Fluor 488 *Monoclonal Antibody Labeling kit* (Molecular Probes, Invitrogen) seguendo le informazioni fornite dalla ditta.

3.9 Isolamento dei monociti e dei granulociti da *buffy coat*

I granulociti (PMN: *polymorphonuclear cells*) ed i monociti sono stati isolati da *buffy coat* di donatori sani gentilmente forniti dal Centro Trasfusionale dell’Azienda Ospedaliera di Padova. Il sangue, è stato diluito con PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS, Biowhittaker) e stratificato su gradiente di densità di *Ficoll-Paque PLUS* (GE Healthcare-Amersham). Dopo la centrifuga, l'anello contenente i PBMC è stato raccolto, trasferito in una nuova provetta e lavato tre volte con PBS contenente 1% di siero umano (*HS, Human Serum Type AB*, Biowhittaker); il *pellet* di PMN e RBC (*red blood cells*, globuli rossi) è stato mescolato con destrano (Pharmacia) ad una concentrazione finale dell'1% ed incubato per 20 minuti a temperatura ambiente. La fase sovrastante arricchita di PMN è stata prelevata e, allo scopo di rimuovere i globuli rossi, le cellule sono state sottoposte a lisi ipotonica,

risospendendole prima in 3 ml di NaCl 0.2% (Sigma-Aldrich) per 2 minuti e, poi, aggiungendo 7 ml di 1.2% NaCl per normalizzare l'isotonicità.

I PBMC sono poi stati risospesi alla concentrazione di 10×10^6 cellule/ml in RPMI 1640 addizionato del 3% di HS e piastrati in fiasche T25 (Falcon BD) per un'ora, a 37°C e al 5% di CO₂. Le cellule non aderenti sono poi state rimosse lavando gentilmente le fiasche con RPMI 1640; i monociti aderenti sono poi stati recuperati lavando le fiasche con PBS addizionato di EDTA 2mM. La purezza delle frazioni ottenute è stata controllata al FACSCalibur (BD Biosciences) mediante analisi citofluorimetrica dei parametri morfologici di FSC e SSC; la vitalità cellulare è stata invece valutata mediante colorazione con Trypan blue (Sigma-Aldrich).

3.10 Microscopia confocale

Le frazioni isolate da midollo *ex-vivo*, la frazione CD16⁻/CD11b^{low/-} isolata dalle BM-MDSC, i PMN ed i monociti maturi isolati da *buffy coat*, sono stati utilizzati per la valutazione dell'espressione di alcuni marcatori mediante analisi di microscopia confocale. In particolar modo, le frazioni isolate da midollo *ex-vivo* o dalle BM-MDSC sono state mantenute in FBS (Gibco, Invitrogen) per almeno un'ora in modo da far riprendere le cellule dallo *stress* subito durante la separazione cellulare. Le cellule sono poi state fatte aderire su vetrini di 14 mm di diametro (Menzel-Glaser) ricoperti di L-polilisina (Sigma-Aldrich) riposti all'interno di una piastra da 24 pozzetti (Falcon, BD). Le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% (Sigma-Aldrich) per 15 minuti a temperatura ambiente e poi permeabilizzate per 5 minuti con PBS-0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) pH 7.4. Le cellule, dopo essere state sottoposte a saturazione per un'ora a temperatura ambiente con PBS-2% BSA (Sigma-Aldrich) e 5% di siero di capra (Sigma-Aldrich), sono state incubate con gli anticorpi primari diluiti in PBS-0.5% Tween20 (Sigma-Aldrich) per un'ora, al buio e a temperatura ambiente. I vetrini sono poi stati lavati con PBS-0.5% Tween20 e alle cellule sono stati aggiunti gli anticorpi secondari, diluiti in PBS-0.5% Tween20, per un'ora a temperatura ambiente ed al buio. Per la visualizzazione dei nuclei, le cellule sono state marcate con il DAPI (Invitrogen) per 5 minuti a temperatura ambiente ed al buio. I vetrini sono poi stati montati con il *FluorPreserve*TM (Calbiochem) o il *ProLong® Gold Antifade* (Invitrogen) e analizzati mediante microscopia confocale (FluoView FV1000, Olympus; o TCS SP5, Leica Microsystems CMS GmbH). Le

immagini sono state analizzate utilizzando i *software* FV10-ASW 2.0 *Viewer* (Olympus), LAS AF Lite (Leica Microsystems CMS GmbH) e ImageJ (NIH Bethesda, USA). Le immagini (800x800 *pixels* nel FV1000; 1024x1024 *pixels* nel TCS SP5) sono state acquisite utilizzando un obiettivo ad immersione in olio (60x nel FV1000; 63x nel TCS SP5; NA=1.35). Gli anticorpi utilizzati per la microscopia confocale sono stati i seguenti: anti-IL4R α (monoclonale di topo, R&D Systems), anti-IL4R α biotinilato (monoclonale di topo, BD Biosciences), anti-CD132 biotinilato (*common γ chain*, monoclonale di ratto, BD Biosciences), anti-IL13R α 1 (monoclonale di topo, CellSciences) anti-MPO (policlonale di coniglio, DAKO) e relativo controllo isotipico IgG (DAKO), anti-Arg-I – Alexa Fluor 488 (monoclonale di topo, sezione 3.8) e relativo controllo isotipico IgG1-Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati tutti forniti dall'Invitrogen (Molecular Probes) ad eccezione dell'avidina-FITC (BioLegend).

3.11 Western blot

Due linee cellulari, le SICA-EBV (linea cellulare umana linfoblastoide trasformata con EBV) e le K562 (linea cellulare umana eritromieloblastoide), sono state utilizzate come controlli positivi per la fosforilazione di STAT6 rispettivamente dopo trattamento con IL-4 e IL-13.

1×10^6 cellule di SICA-EBV, di K562 e della frazione soppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-} isolata dalle BM-MDSC sono state trattate in agitazione per 15 minuti a 37°C in presenza o meno di 100 ng/ml di IL-4 o IL-13 (PeproTech Inc.). Le cellule sono state lavate con PBS freddo e centrifugate a 450g per 6 minuti a 4°C. E' stato poi effettuato un secondo lavaggio delle cellule con PBS addizionato degli inibitori delle proteasi (*Protease Inhibitor cocktail III*, Calbiochem) diluito 1:100. Il *pellet* è stato subito congelato in azoto liquido e conservato a -80°C.

L'estrazione della frazione proteica totale è stata effettuata risospendendo il *pellet* cellulare nel *buffer* di lisi (*triple lysis buffer*: 50mM Tris-HCl pH 8.8, 150mM NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% SDS, 1% NP40, 10mM PMSF, 10mM Na₃OV₄, 100mM aprotinina, 5 mM EDTA, 100mM antipaina, *Protease Inhibitor cocktail III* diluito 1:10) e mantenendolo in ghiaccio per 30 minuti, e agitandolo ogni 10 minuti. Alla fine dell'incubazione il lisato cellulare è stato centrifugato a 6000g per 4 minuti a

4°C. Il surnatante è stato recuperato ed è stata effettuata la determinazione proteica utilizzando il metodo di *Bradford*.

40 µg e 50 µg di estratto proteico totale rispettivamente delle linee cellulari e della frazione CD16⁻/CD11b^{low/-} sono stati separati tramite SDS-PAGE con un gel all'8% di acrilammide; al termine della corsa elettroforetica, il trasferimento delle proteine su membrana di PVDF (Millipore) è stato effettuato overnight a 4°C. La membrana è stata poi saturata con *Tris Buffer Solution-Tween20* 0.1% (TBS-T) addizionato di 5% di *non-fat dried milk* (Sigma Aldrich) per 1 ora a temperatura ambiente. L'ibridazione con l'anticorpo primario è stata effettuata incubando la membrana con anti-pSTAT6 (policlonale di coniglio, Cell Signaling Technology Inc.) in TBS-T al 5% di BSA overnight a 4°C. Il giorno dopo sono stati eseguiti quattro lavaggi di 10 minuti con TBS-T, al termine dei quali è stata effettuata l'ibridazione con l'anticorpo secondario (*HRP-conjugated, donkey anti rabbit IgG*, GE Healthcare-Amersham) per 1 ora a temperatura ambiente in TBS-T al 5% di non-fat dried milk. Come controllo di trasferimento e come controllo interno, la membrana è stata re-incubata con anticorpo anti-actina (policlonale di coniglio, Sigma Aldrich) diluita in PBS-Tween20 0.05%. La membrana è stata poi sviluppata su lastre Hyperfilm (GE Healthcare-Amersham) utilizzando il *SuperSignal West Pico Chemiluminescent* (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc.).

3.12 Preparazione dei citospin

I citospin sono stati ottenuti tramite centrifugazione di 1×10^5 cellule su un vetrino e colorazione con i coloranti May-Grünwald e Giemsa (Bio-Optica) per rispettivamente 5 e 15 minuti. La morfologia cellulare è stata poi esaminata utilizzando il microscopio Leica D.M. 2000 (Leica Microsystems) con un obiettivo di 40x. Le immagini sono state scattate utilizzando la fotocamera Leica DFC 295 (Vashaw Scientific Inc.), acquisite utilizzando il *software* Leica Acquisition Suite versione 3.5 (Meyer Instruments) e processate con Adobe Photoshop CS1 (Adobe Systems).

3.13 Analisi statistica

Tutti i dati riportati sono stati espressi come medie \pm errore standard (SE). Per tutte le analisi statistiche è stato effettuato il test di *Student*. I risultati sono stati considerati significativi con $P < 0.05$, come indicato dagli asterischi.

4. RISULTATI

4.1 Induzione *in vitro* di MDSC umane a partire da sangue midollare trattato con una combinazione di citochine

Diversi autori hanno messo in evidenza il fatto che le MDSC sono costituite da una popolazione molto eterogenea di cellule comprendente sia progenitori mieloidi che cellule mieloidi immature⁴⁷. Le cellule tumorali rilasciano diversi fattori solubili quali COX2, prostaglandine, SCF, M-CSF, GM-CSF, IL-6 e VEGF⁴⁷ che inducono un aumento della mielopoiesi ed una conseguente espansione di cellule mieloidi immature che vengono richiamate nella circolazione sistemica, negli organi linfoidi secondari e nel sito tumorale dove esercitano la loro funzione soppressoria nei confronti dei linfociti T¹³¹.

A partire da queste considerazioni abbiamo deciso di indagare se il trattamento con alcuni fattori ematopoietici potesse indurre i progenitori mieloidi presenti nel sangue midollare di donatori sani a differenziare in cellule aventi attività immunosoppressoria. Abbiamo pertanto valutato l'effetto di alcune citochine aggiunte singolarmente o in combinazione. Abbiamo scelto di testare le citochine G-CSF, GM-CSF e IL-6, poiché hanno un ruolo nel reclutamento, nella proliferazione e maturazione dei precursori granulocitari e monocitari.

4.1.1 Caratterizzazione *ex-vivo* dell'immunofenotipo e dell'attività soppressoria di cellule di aspirato midollare

Utilizzando determinate combinazioni di marcatori mieloidi, quali il CD16/CD11b e CD14/CD15, è possibile determinare lo stadio di maturazione delle cellule mieloidi in un campione di midollo valutando sia l'espressione sia l'intensità con cui questi marcatori sono espressi sulla superficie cellulare¹³²⁻¹³³.

In Figura 7a è riportato il profilo maturativo di un aspirato midollare. I mieloblasti, ovvero i precursori mieloidi sia dei monociti che dei granulociti, sono CD16⁻/CD11b⁻. Proseguendo nel processo di maturazione viene acquisito prima il CD11b che viene espresso con diverse intensità a livello dei promielociti. Dallo stadio differenziativo dei mielociti comincia a comparire il CD16 che viene

altamente espresso sui granulociti maturi che sono CD16⁺/CD11b⁺. I monociti maturi, a differenza dei granulociti, non presentano l'espressione del CD16.

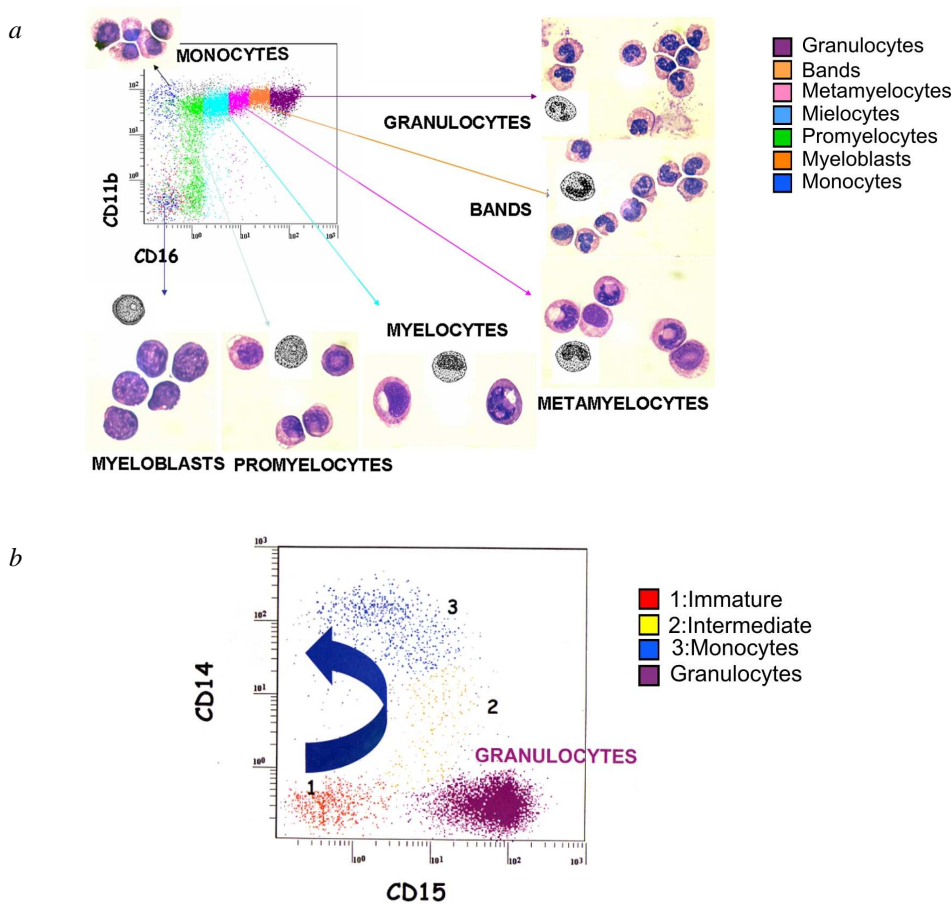


Figura 7

Profilo maturativo delle cellule mieloidi in un aspirato midollare attraverso l'analisi di diversi marcatori mieloidi.

a. Analisi del profilo maturativo di cellule mieloidi attraverso la combinazione dei marcatori CD16 e CD11b. Le cellule più immature CD16⁻/CD11b⁻ differenziano progressivamente verso cellule più mature esprimendo prima il CD11b e poi il CD16 con diverse intensità. I mieloblasti sono CD16⁻ CD11b⁻, i promielociti esprimono il CD16 a bassa intensità mentre esprimono in modo variabile il CD11b. Con il procedere della maturazione cellulare si osserva un aumento dell'intensità dell'espressione del CD16 mentre il CD11b rimane costante: i monociti sono CD16⁻/CD11b⁺ mentre i granulociti maturi sono CD16⁺/CD11b⁺.

b. L'analisi di espressione dei marcatori CD14 e CD15 permette di discriminare la differenziazione dei precursori mieloidi in senso monocitario o in senso granulocitario. Le cellule mieloidi immature non esprimono né il CD14 né il CD15 (1); proseguendo con il processo di maturazione, le cellule negli stadi intermedi di maturazione coesprimono entrambi i marcatori (2). Negli stadi finali di maturazione è possibile distinguere la popolazione di monociti maturi CD14⁺CD15⁻ (3) e la popolazione di granulociti maturi CD14⁻CD15⁺. Le immagini sono state gentilmente fornite dal Prof. Basso del Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova.

Per poter discriminare il compartimento monocitario da quello granulocitario è possibile utilizzare la combinazione dei i marcatori CD14 (caratteristico dei monociti) e CD15 (caratteristico dei granulociti). Come raffigurato in Figura 7b, la marcatura con la combinazione di tali marcatori permette di identificare i precursori staminali ematopoietici (CD14⁻CD15⁻), gli stadi di differenziazione intermedi (CD14⁺CD15⁺) e le cellule mature che si distinguono in monociti (CD14⁺CD15⁻) e granulociti (CD14⁻CD15⁺).

Associando entrambe le combinazioni di marcatori con l'IL4R α (CD124), un marcatore associato alle MDSC umane e murine ^{73,89}, abbiamo potuto osservare che nell'aspirato midollare non vi è la presenza di cellule IL4R α ⁺, come è possibile osservare in Figura 8a. Per valutare l'eventuale presenza di cellule ad attività immunosoppressoria nel midollo *ex-vivo*, abbiamo testato la capacità di tali cellule di interferire con la proliferazione di PBMC marcati con il colorante fluorescente CFSE ed attivati per quattro giorni con un anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene CD3. Come riportato in Figura 8b, l'aggiunta delle cellule di midollo *ex-vivo* non è in grado di inibire la proliferazione linfocitaria.

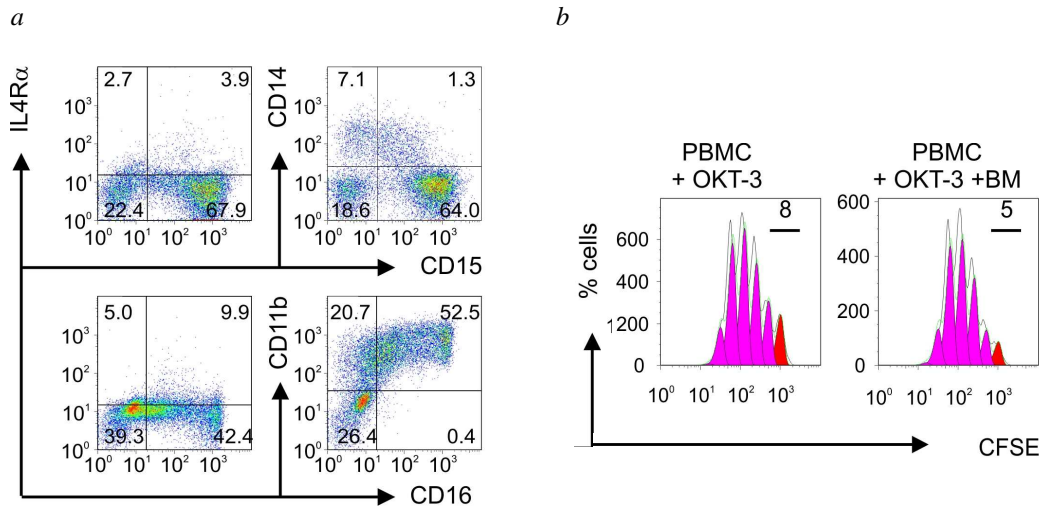


Figura 8

Analisi immunofenotipica e funzionale del midollo *ex-vivo*.

a. Le cellule di sangue midollare, dopo essere state emolizzate, sono state marcate con gli anticorpi anti-CD16, anti-CD11b, anti-CD14 e anti-CD15 per analizzare il profilo di maturazione. I dot-plot rappresentativi della combinazione del CD16 con il CD11b e del CD14 con il CD15 evidenziano la presenza di tutti gli stadi differenziativi delle cellule mieloidi, comprese i monociti e i granulociti maturi.

b. Proliferazione linfocitaria di PBMC CFSE⁺ attivati per quattro giorni con un anticorpo monoclonale anti-CD3. L'istogramma di destra rappresenta il controllo di proliferazione dei soli PBMC; l'istogramma di sinistra rappresenta il profilo di proliferazione dei PBMC in presenza di cellule di midollo *ex-vivo* aggiunte in un rapporto di 1:1. Il picco rosso rappresenta la generazione parentale mentre i picchi rosa rappresentano le generazioni cellulari generate in risposta allo stimolo mitogenico.

4.1.2 Il trattamento *in vitro* delle cellule midollari con G-CSF, GM-CSF e IL-6 induce l'espansione di cellule con fenotipo immunosoppressorio.

Le cellule di aspirato midollare, dopo essere state emolizzate, sono state in parte coltivate per 4 giorni in presenza di G-CSF, GM-CSF, IL-6 e delle loro combinazioni ed in parte coltivate senza l'aggiunta di alcun fattore di crescita. Alla fine della coltura le cellule sono state raccolte ed è stata ripetuta la stessa analisi fenotipica effettuata sul midollo *ex-vivo*. Come è possibile osservare in Figura 9a il profilo di maturazione del midollo cambia a seconda del *cocktail* di citochine utilizzato. Il midollo coltivato in assenza di fattori di crescita mostra una percentuale più elevata di cellule con fenotipo CD16⁺/CD11b^{high} (67.8% ± 4.7), corrispondente ai granulociti

maturi, rispetto ai campioni trattati con G-CSF+GM-CSF o con GM-CSF+IL-6 (rispettivamente $57.6\% \pm 5.3$ e $53.2\% \pm 7.3$). Il trattamento con le diverse citochine induce invece l'accumulo di cellule a fenotipo più immaturo caratterizzate da una minore espressione del CD16. Il trattamento con G-CSF induce l'accumulo di cellule appartenenti a diversi stadi di maturazione compresi i granulociti maturi $CD16^+/CD11b^{high}$. Il trattamento con GM-CSF, invece, spinge verso l'accumulo di cellule $CD11b^+$ più immature comprendenti le diverse sottopopolazioni mieloidi di mielociti, metamielociti e cellule a banda, che costituiscono uno spettro continuo di maturazione caratterizzato da un incremento dell'espressione del CD16, mentre vi è la presenza di una percentuale esigua di granulociti maturi. La combinazione di G-CSF+GM-CSF o di GM-CSF+IL-6 induce, invece, l'accumulo di cellule $CD16^-/CD11b^+$ più immature (rispettivamente $35.1\% \pm 6.5$ e $40.7\% \pm 9.2$), corrispondenti a cellule con fenotipo caratteristico dei promielociti, che nel midollo coltivato in assenza dei fattori di crescita risultano essere meno espanse ($22.6\% \pm 4.7$). L'analisi dell'espressione dell'IL4R α , riportato negli istogrammi della Figura 9a, mette in evidenza la capacità di tutte le citochine di indurre un'espansione di cellule IL4R α^+ anche se la combinazione di G-CSF+GM-CSF risulta indurre una maggiore espansione di cellule a fenotipo immunosoppressorio.

G-CSF e GM-CSF sono entrambe citochine responsabili della proliferazione dei precursori midollari rispettivamente dei granulociti e dei monociti. Un recente studio da noi condotto su sangue periferico di pazienti affetti da melanoma e carcinoma del colon ha evidenziato l'espansione di cellule ad attività immunosoppressoria sia nel compartimento monocitario ($CD14^+/IL4R\alpha^+$) che in quello granulocitario ($CD15^+/IL4R\alpha^+$)^{73,89}. Come riportato in Figura 9b tutte le combinazioni di citochine inducono un incremento di entrambe queste popolazioni cellulari; la combinazione di G-CSF e GM-CSF ancora una volta è risultata essere la combinazione di citochine che, nell'uomo, è in grado di generare *in vitro* cellule con la più alta espressione di IL4R α . Rispetto alle cellule midollari coltivate in assenza di citochine, i campioni coltivati con G-CSF+GM-CSF presentano una maggiore espansione sia di cellule $CD14^+/IL4R\alpha^+$ ($P = 0.03$) che di cellule $CD15^+/IL4R\alpha^+$ ($P = 0.008$).

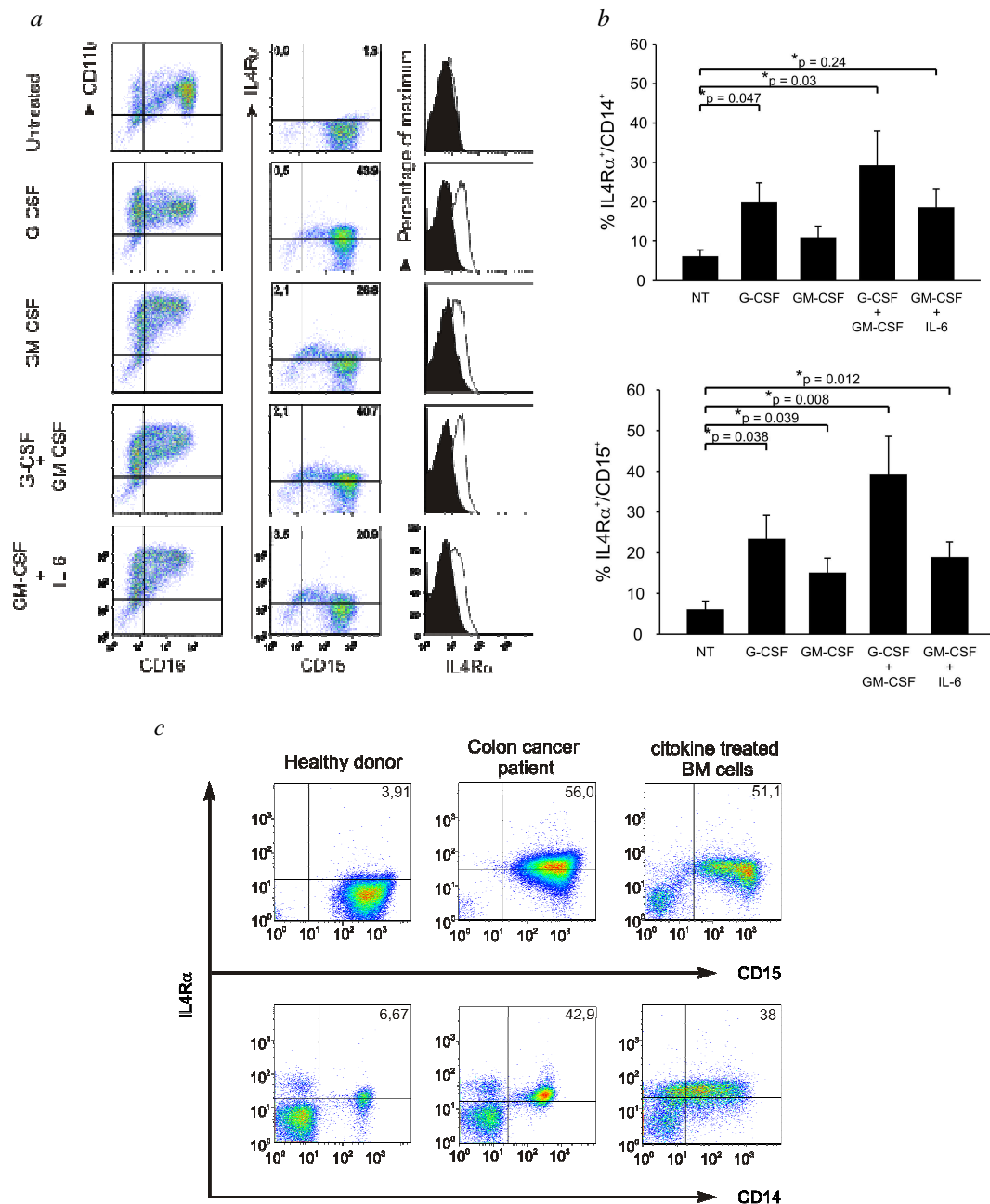


Figura 9

Analisi immunofenotipica delle cellule midollari trattate con diverse combinazioni di citochine e confronto con le MDSC identificate nel sangue periferico di pazienti affetti da tumore.

a. Profilo di maturazione delle cellule midollari analizzato attraverso la combinazione dei marcatori CD16 e CD11b. Gli istogrammi raffigurano l'espansione di cellule IL4Rα⁺ ad immunofenotipo soppressorio (la curva nera rappresenta il segnale di *background* dato dal controllo isotipico, la curva bianca rappresenta l'intensità di fluorescenza dell'IL4Rα).

b. Analisi statistica dell'accumulo di cellule CD14⁺IL4Rα⁺ (in alto) e di cellule CD15⁺IL4Rα⁺ (in basso) nel midollo trattato con le diverse combinazioni di citochine in relazione al midollo coltivato in assenza dei fattori di crescita. Le barre rappresentano: 6 esperimenti per il G-CSF, 6 esperimenti per il GM-CSF, 6 esperimenti per il G-CSF+GM-CSF e 5 esperimenti per il GM-CSF+IL-6. La

percentuale di cellule $IL4R\alpha^+$ è stata calcolata sottraendo alla percentuale di cellule esprimenti $IL4R\alpha$ la percentuale di cellule che ricadono sotto la curva del controllo isotipico.

c. Confronto tra il profilo immunofenotipico delle cellule $CD15^+IL4R\alpha^+$ (in alto) e di cellule $CD14^+IL4R\alpha^+$ (in basso) presenti nel sangue periferico di un donatore sano (*HD*), di un paziente con carcinoma del colon e di cellule di midollo trattate *in vitro* con la combinazione di G-CSF e GM-CSF.

Infine abbiamo confrontato il fenotipo delle MDSC derivate *in vitro* da precursori midollari e le MDSC identificate nel sangue periferico di pazienti affetti da tumore. Come riportato in Figura 9c, dove sono messi a confronto i fenotipi delle cellule mieloidi presenti nel sangue di un donatore sano, di un paziente affetto da carcinoma del colon e di cellule provenienti da un campione di midollo coltivato per 4 giorni con G-CSF e GM-CSF, si evidenzia un profilo di espressione simile tra le cellule espanse nel sangue di pazienti affetti da tumore e le cellule espanse nel midollo trattato con la combinazione di G-CSF e GM-CSF.

L'IL-6 è una citochina pleiotropica coinvolta nella regolazione del sistema immunitario e dell'ematopoiesi. Numerose evidenze sperimentali indicano inoltre un coinvolgimento dell'IL-6 in diverse condizioni patologiche quali l'infiammazione, le malattie autoimmunitarie e le neoplasie¹³⁴. L'IL-6 è stata identificata in molti tipi di tumore: alti livelli di IL-6, inoltre, sono spesso associati ad una cattiva prognosi della malattia¹³⁵. Studi recenti inoltre suggeriscono che l'IL-6 possa essere rilasciata precocemente durante lo sviluppo neoplastico sia dalle cellule trasformate sia dalle cellule mieloidi infiltranti il tumore¹³⁵⁻¹³⁷. A differenza del modello murino in cui la combinazione di GM-CSF+IL-6 risulta essere quella migliore per indurre *in vitro* le MDSC⁶⁹, nell'uomo il trattamento in grado di indurre una maggiore espansione di cellule $IL4R\alpha^+$ risulta essere la combinazione di G-CSF+GM-CSF. Per verificare se il trattamento dei precursori midollari con questa combinazione di citochine potesse indurre il rilascio di IL-6 da parte delle colture, abbiamo testato in ELISA alcuni surnatanti prelevati al 4° giorno di coltura del midollo trattato con le diverse combinazioni di citochine. Come è possibile osservare in Figura 10 anche nei surnatanti di coltura del midollo trattato con G-CSF+GM-CSF è presente un discreto livello di IL-6 (~263 pg/ml), dello stesso ordine di grandezza rispetto a quella aggiunta esogenamente. Tuttavia, come verrà discusso più avanti nel testo, i migliori dati funzionali sono stati ottenuti utilizzando la combinazione G-CSF+GM-CSF e,

pertanto, tutti i successivi esperimenti sono stati condotti utilizzando tale combinazione.

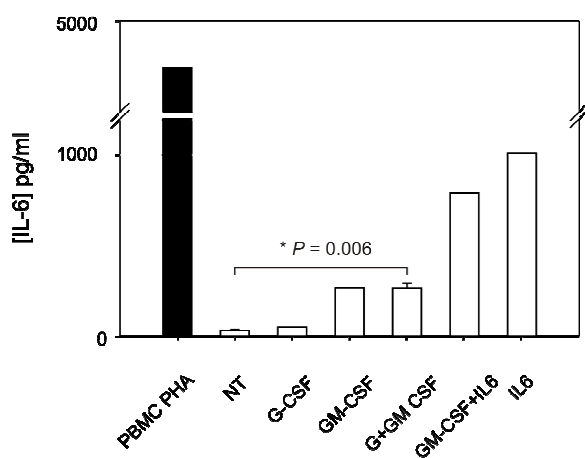


Figura 10

Determinazione quantitativa della presenza dell'IL-6 nel surnatante di coltura di cellule di midollo trattate con le diverse combinazioni di citochine.

Quantità di IL-6 contenuta nel surnatante di coltura del midollo trattato con la combinazione delle diverse citochine al 4° giorno di coltura. Come controllo positivo è stato utilizzato il surnatante di coltura di PBMC stimolati per 48 ore con 10 µg/ml di PHA¹³⁸. Nel grafico è riportata anche la significatività statistica (*P*) della variazione di concentrazione di IL-6 nei surnatanti di coltura delle cellule di midollo non trattate (*n* = 4) e trattate con la combinazione di G-CSF e GM-CSF (*n* = 10). Le barre relative agli altri trattamenti sono relative alla misurazione di soli due campioni.

4.1.3 Il trattamento del midollo con la combinazione di G-CSF+GM-CSF induce l'espansione di cellule ad attività immunosoppressoria

Dopo aver caratterizzato il fenotipo delle cellule del midollo trattato con le citochine, abbiamo testato la capacità di tali cellule di inibire la proliferazione di PBMC marcati con il CFSE ed attivati sia con mitogeni, in modo antigene-indipendente utilizzando anticorpi monoclonali anti-CD3/CD28, sia attivati da alloantigeni (MLR), utilizzando un *pool* di PBMC allogenic *stimulator* γ -irradiati. Come riportato in Figura 11, le cellule di midollo trattate con la combinazione di G-CSF+GM-CSF (e da qui denominate BM-MDSC) sono in grado di inibire la proliferazione linfocitaria in entrambe le condizioni di coltura in modo statisticamente significativo rispetto alle cellule di midollo non trattate con alcun fattore di crescita (*P* = 0.012).

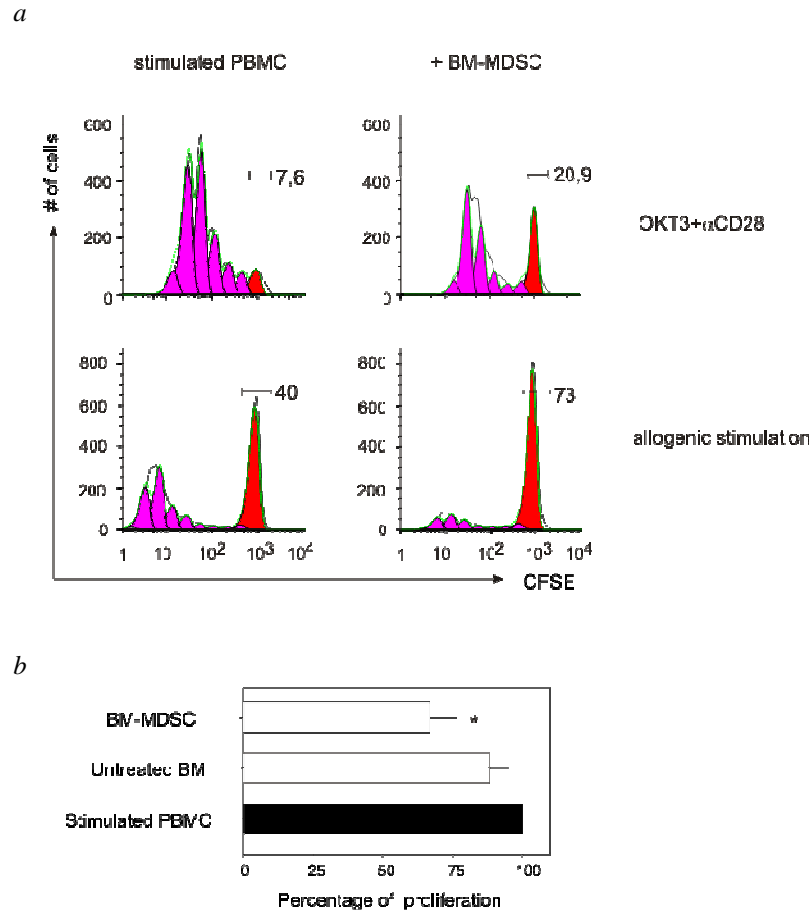


Figura 11

Valutazione dell'attività soppressoria delle BM-MDSC in due diversi saggi di proliferazione linfocitaria.

a. Esempio rappresentativo della capacità delle BM-MDSC di inibire la proliferazione linfocitaria di PBMC CFSE⁺. Alla fine della coltura le cellule sono state raccolte, marcate con un anticorpo anti-CD3 ed analizzate mediante citometria a flusso. La proliferazione antigene-indipendente viene testata dopo 4 giorni di stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3/CD28 (in alto); la proliferazione antigene-dipendente viene invece analizzata al 7° giorno di una MLR allestita utilizzando PBMC *stimulator* allogenici (in basso). Gli istogrammi rappresentano i profili di proliferazione dei PBMC stimolati in assenza (a sinistra) o in presenza (a destra) delle BM-MDSC aggiunte in un rapporto di 1:1. Il picco rosso rappresenta la generazione parentale mentre i picchi rosa rappresentano le diverse generazioni proliferanti.

b. Soppressione della proliferazione di PBMC CFSE⁺ attivati in presenza delle BM-MDSC, aggiunte in rapporto 1:1, dopo 4 giorni di coltura con anti-CD3/CD28. La quantificazione della proliferazione è stata effettuata analizzando, nel *gate* CFSE⁺CD3⁺, il numero di cellule proliferanti dalla 3^a alla 10^a generazione rapportando al 100% il controllo di proliferazione senza l'aggiunta delle BM-MDSC. Il grafico è rappresentativo di dodici esperimenti indipendenti. * $P = 0.012$.

Alcuni studi hanno messo in evidenza che la capacità soppressoria delle MDSC può essere valutata anche in base alla riduzione della produzione di interferone gamma (IFN- γ) secreto da PBMC attivati^{80,83,88,122}. Per determinare se anche le BM-MDSC da noi derivate fossero in grado di ridurre la produzione di IFN- γ rilasciato dai PBMC attivati, abbiamo monitorato, durante i quattro giorni di coltura in presenza di anti-CD3/CD28, la percentuale di linfociti T produttori IFN- γ mediante analisi citofluorimetrica eseguita dopo marcatura intracellulare con un anticorpo monoclonale specifico per la citochina. Come è possibile osservare in Figura 12, i PBMC attivati in assenza delle BM-MDSC presentano un incremento rilevante della percentuale di cellule produttrici IFN- γ al secondo e al terzo giorno di coltura con anti-CD3/CD28. Analizzando i PBMC attivati in presenza delle BM-MDSC negli stessi giorni di coltura, si può osservare che la percentuale di linfociti T secernenti IFN- γ cala drasticamente dimostrando così che le BM-MDSC sono in grado di ridurre la produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T attivati.

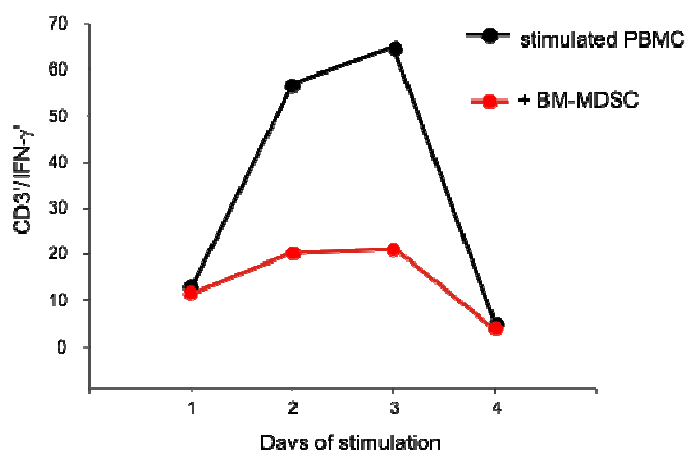


Figura 12

Le BM-MDSC inducono la riduzione dell'IFN- γ rilasciato da linfociti T attivati.

I PBMC marcati con CFSE ed attivati con anti-CD3/CD28 sono stati coltivati in presenza o meno delle BM-MDSC per 4 giorni. Nei giorni indicati una parte delle colture cellulari è stata incubata per 5 ore con 10 μ g/ml di Brefeldina A in modo da bloccare il rilascio dell'IFN- γ . Alla fine dell'incubazione le cellule sono state raccolte e marcate con anticorpi monoclonali anti-CD3 ed anti-IFN- γ . La percentuale di cellule produttrici IFN- γ è stata ottenuta analizzando le cellule nel *gate* CFSE⁺/CD3⁺. Nel grafico è rappresentato l'andamento della percentuale di cellule CD3⁺ produttrici IFN- γ nei PBMC attivati in assenza (curva nera) o in presenza delle BM-MDSC aggiunte in rapporto 1:1 (curva rossa).

Un altro evento spesso associato all'immunosoppressione è la riduzione dell'espressione della catena ζ del complesso del CD3 espresso sui linfociti T. Questa catena è necessaria per la trasduzione intracellulare del segnale di riconoscimento dell'antigene da parte del TCR espresso sui linfociti T. È stato dimostrato che la diminuzione dell'espressione della catena ζ del CD3 induce la riduzione della proliferazione linfocitaria e, in alcuni casi, induce anche l'apoptosi degli stessi linfociti T ^{103-104,139}.

Un numero più limitato di studi invece ha messo in evidenza come, in pazienti affetti da tumore, oltre alla riduzione dell'espressione della catena ζ del CD3, vi possa essere anche una diminuzione dell'espressione della catena ϵ del CD3 ¹⁴⁰⁻¹⁴¹. La riduzione dell'espressione del CD3 ϵ , espresso sulla superficie cellulare, può avere un ruolo chiave nei meccanismi utilizzati dal tumore per evadere il riconoscimento da parte del sistema immunitario ¹⁴².

Per testare se questi due eventi potessero essere associati alla soppressione mediata dalle BM-MDSC abbiamo valutato l'intensità di espressione delle catene CD3 ζ e CD3 ϵ , rispettivamente intra ed extracellulare, allestendo delle MLR allogene in cui a PBMC *responder*, marcati con il CFSE ed attivati con un *pool* di PBMC *stimulator* γ -irradiati, sono state aggiunte le BM-MDSC in rapporto 1:1. Al 7° giorno di coltura le cellule sono state raccolte e marcate con anticorpi monoclonali diretti contro il CD8 e le catene CD3 ϵ e ζ . L'analisi citofluorimetrica è stata poi condotta valutando l'intensità di fluorescenza media (MFI) del CD3 ϵ all'interno della popolazione CFSE⁺/CD3 ϵ ⁺ e la MFI del CD3 ζ all'interno della popolazione CFSE⁺/CD3 ϵ ⁺/CD8⁺. Come è possibile osservare in Figura 13 la soppressione della proliferazione linfocitaria mediata dalle BM-MDSC è accompagnata da una diminuzione statisticamente significativa sia della catena ζ (Figura 13a, $P = 0.034$) che della catena ϵ (Figura 13b, $P < 0.001$) del complesso recettoriale del CD3 espresso sui linfociti T.

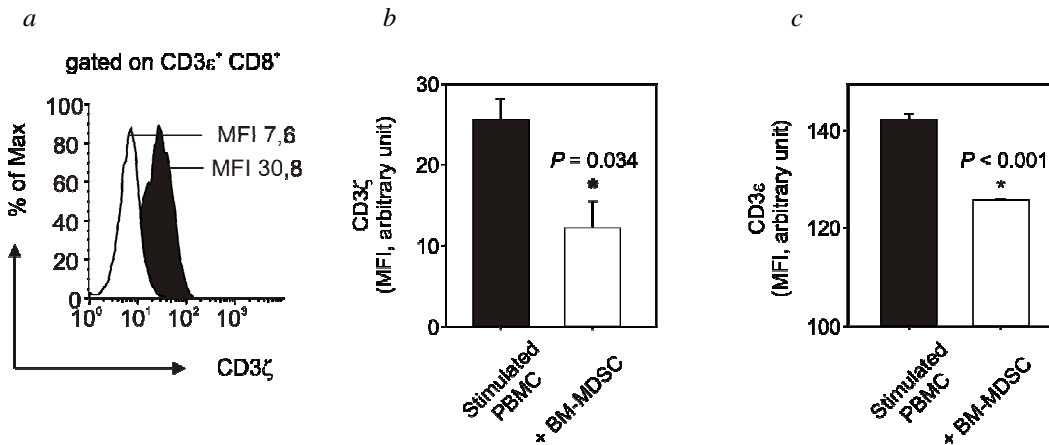


Figura 13

L'immunosoppressione mediata dalle BM-MDSC è accompagnata dalla diminuzione dell'espressione delle catene ζ ed ϵ del complesso recettoriale CD3 espresso sui linfociti T.

a. Istogramma rappresentativo della diminuzione della intensità media di fluorescenza della catena ζ del complesso recettoriale CD3 espresso sui linfociti T $CD8^+$ mediata dalle BM-MDSC. La curva nera rappresenta il controllo di proliferazione dei PBMC in assenza delle BM-MDSC, la curva bianca rappresenta l'espressione della catena ζ dei PBMC attivati a cui sono state aggiunte le BM-MDSC in rapporto 1:1. L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata analizzando l'MFI del CD3 ζ nel gate CFSE $^+$ CD3 ϵ^+ CD8 $^+$. Rappresentazione della diminuzione della catena ζ (b) e della catena ϵ (c) del complesso recettoriale CD3 espresso sui linfociti T mediata dalle BM-MDSC. Il grafico si riferisce a tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il *t-test*; il valore della significatività statistica (*P*) è indicato.

4.1.4 Il trattamento del midollo con G-CSF+GM-CSF induce l'accumulo di cellule mieloidi immature ad elevata attività soppressoria

Analizzando il profilo di espressione dei marcatori mieloidi CD16 e CD11b in molte colture di BM-MDSC, abbiamo notato che i midolli più immaturi, caratterizzati da un maggior accumulo di cellule CD16 $^-$ (Figura 14a), presentavano un'attività soppressoria maggiore rispetto alle colture di BM-MDSC che avevano una quota maggiore di cellule più mature CD16 $^+$ (Figura 14b). Questo dato ci ha fatto ipotizzare che la soppressione delle BM-MDSC fosse legata all'accumulo di cellule mieloidi immature (CD16 $^-$). Confrontando i valori percentuali delle cellule CD16 $^-$ /CD11b $^+$ all'interno delle BM-MDSC con i valori percentuali delle stesse cellule presenti in campioni di midolli coltivati per 4 giorni in assenza di citochine abbiamo osservato un'espansione statisticamente significativa di questa popolazione immatura dopo il trattamento con G-CSF+GM-CSF (Figura 14c, *P* < 0.001). Dall'analisi di

correlazione di *Pearson* risulta inoltre che l'espansione di queste cellule è legata in riportato in Figura 14d ($P = 0.00306$).

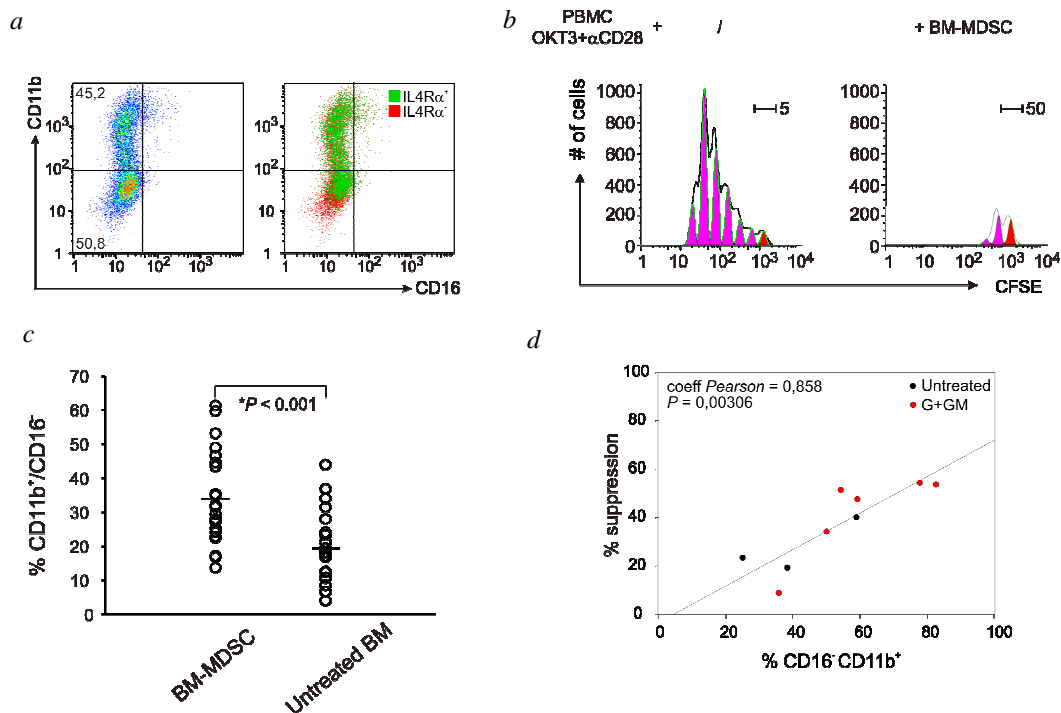


Figura 14

L'accumulo di cellule CD16⁻ nelle BM-MDSC è direttamente correlato all'attività soppressoria.

a. Profilo di maturazione delle cellule mieloidi secondo l'espressione dei marcatori CD16 e CD11b. Nel *dot-plot* di destra si può osservare l'accumulo di cellule IL4Rα⁺ (in verde). Dal profilo maturativo le cellule sembrano essere tutti promielociti.

b. Analisi della proliferazione di PBMC CFSE⁺ in assenza (isogramma di sinistra) o in presenza (istogramma di destra) delle BM-MDSC a profilo maturativo CD16⁻. Le BM-MDSC sono state aggiunte ai PBMC *responder* attivati in un rapporto di 1:1. In rosso è rappresentata la generazione parentale, in rosa sono rappresentate le generazioni proliferanti.

c. Confronto statistico tra la percentuale di cellule immature CD16⁻/CD11b⁺ in campioni di midollo coltivati in assenza di citochine o trattati con G-CSF+GM-CSF per 4 giorni. Il grafico rappresenta 22 esperimenti indipendenti, nei quali le colture sono state allestite parallelamente.

d. Analisi di correlazione tra la percentuale di cellule CD16⁻/CD11b⁺ accumulate in campioni di midollo coltivati in assenza di citochine o trattati con G-CSF+GM-CSF e la percentuale di soppressione. La percentuale di cellule proliferanti è stata calcolata nel *gate* CFSE⁺/CD3⁺ prendendo in considerazione, dopo 4 giorni di attivazione con anticorpi monoclonali anti-CD3/CD28, le cellule proliferanti a partire dalla 3^a generazione. I valori di soppressione sono stati poi calcolati rapportando al 100% il controllo di proliferazione senza l'aggiunta delle BM-MDSC. In rosso sono rappresentati i valori relativi a campioni di midollo trattati per quattro giorni con G-CSF+GM-CSF (BM-MDSC) mentre in nero sono rappresentati campioni di midollo mantenuti per quattro giorni in assenza di citochine.

4.2 Definizione della sottopopolazione delle BM-MDSC ad attività immunosoppressoria

Partendo dalla considerazione appena illustrata che midolli altamente immaturi sono anche caratterizzati da un'elevata attività immunosoppressoria, abbiamo deciso di identificare con maggiore precisione la sottopopolazione delle BM-MDSC in grado di inibire la proliferazione linfocitaria. Escludendo i linfociti T in base alle loro caratteristiche morfologiche e in base alla positività per il CD3, abbiamo deciso di separare, mediante citofluorimetro a flusso dotato di modulo *sorting*, tre sottopopolazioni mieloidi: la frazione più immatura $CD16^-/CD11b^{low/-}$, la frazione intermedia $CD16^-/CD11b^+$ e la frazione più matura $CD16^+/CD11b^+$. Come controllo abbiamo effettuato le stesse separazioni anche su midolli *ex-vivo*. Le frazioni così ottenute sono poi state aggiunte a PBMC marcati con CFSE e stimolati con anti-CD3/CD28 per testarne l'attività funzionale. Al 4° giorno di coltura le cellule sono state raccolte e marcate con un anticorpo monoclonale anti-CD3; tramite analisi citofluorimetrica è stato poi analizzato il profilo di proliferazione. In Figura 15 è riportata l'analisi immunofenotipica (colonna a sinistra), morfologica (colonna centrale) e funzionale (colonna a destra) delle cellule midollari analizzate *ex-vivo* (Figura 15a), delle BM-MDSC (Figura 15b) e delle frazioni da esse isolate. Analizzando il profilo del CFSE è possibile notare che né le cellule di midollo *ex-vivo*, né le frazioni da esso isolate, sono in grado di inibire la proliferazione linfocitaria (Figura 15a). L'analisi dell'attività funzionale delle BM-MDSC e delle sottopopolazioni da esse isolate invece ha permesso di identificare in un'unica frazione, ovvero nelle cellule $CD16^-/CD11b^{low/-}$ che corrispondono a quelle più immature, la popolazione delle BM-MDSC dotata di elevata attività soppressoria (Figura 15b).

Analizzando mediante colorazione Giemsa le caratteristiche morfologiche della frazione $CD16^-/CD11b^{low/-}$ isolata dalle BM-MDSC abbiamo osservato che le cellule appartenenti a questa popolazione altamente immunosoppressoria (Figura 15c, $P = 0.002$) possiedono una morfologia simile ai promielociti. Queste cellule inoltre, rispetto alle cellule appartenenti la stessa frazione isolata dal midollo *ex-vivo*, ha un rapporto nucleo-citoplasma maggiore, parametro che generalmente è direttamente correlato al grado di immaturità delle cellule in via di differenziazione.

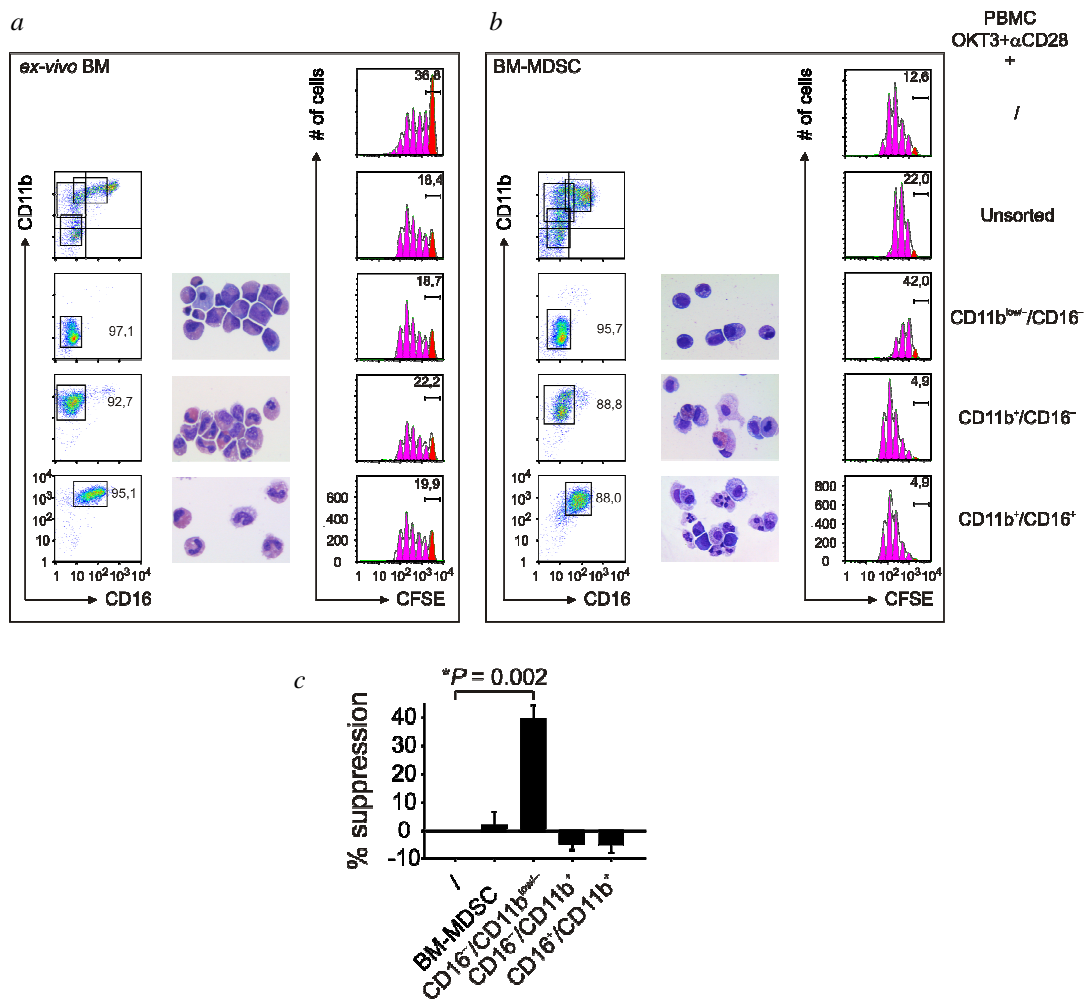


Figura 15

Separazione, attraverso *FACS sorting*, delle sottopopolazioni di BM-MDSC dotate di diversa attività soppressoria.

Separazione delle sottopopolazioni cellulari CD16⁻/CD11b^{low/-}, CD16⁻/CD11b⁺ e CD16⁺/CD11b⁺ a partire da un midollo *ex-vivo* (a) o da BM-MDSC (b). Nella prima colonna è rappresentato un *dot-plot* raffigurante l'analisi dell'espressione dei marcatori CD16 e CD11b del campione analizzato prima della separazione, e delle diverse sottopopolazioni da esso isolate. I valori percentuali riportati si riferiscono alla purezza della separazione. Nella colonna centrale è invece riportata la morfologia cellulare ottenuta mediante colorazione Giemsa. Nella terza colonna è invece riportata l'analisi della proliferazione: il primo istogramma, in alto, è relativo alla coltura dei PBMC di controllo attivati con anti-CD3/CD28 in assenza di cellule mieloidi; gli altri istogrammi si riferiscono invece ai PBMC attivati con anti-CD3/CD28 in presenza delle diverse popolazioni mieloidi.

c. Rappresentazione grafica della soppressione mediata dalla BM-MDSC e dalle sottopopolazioni CD16⁻/CD11b^{low/-}, CD16⁻/CD11b⁺ e CD16⁺/CD11b⁺. La percentuale di cellule proliferanti è stata calcolata nel *gate* CFSE⁺CD3⁺ prendendo in considerazione, dopo 4 giorni di attivazione con anticorpi monoclonali anti-CD3/CD28, le cellule proliferanti a partire dalla 3^a generazione. I valori di soppressione sono stati poi calcolati rapportando al 100% il controllo di proliferazione senza l'aggiunta delle BM-MDSC. Il grafico si riferisce a tre esperimenti indipendenti. Il valore della significatività statistica (*P*) è indicato.

Mediante separazione immunomagnetica abbiamo messo a punto altre due metodiche che ci hanno permesso di isolare la frazione $CD16^-/CD11b^{low/-}$, a partire dalle BM-MDSC e depletando le cellule $CD11b^+$ o Lin^+ ($CD2^+ CD3^+ CD19^+ CD56^+ CD11b^+ CD14^+ CD15^+ CD16^+ CD123^+ CD235a^+$). Un esempio di tali procedure è riportato in Figura 16. Le frazioni ottenute dalle tre diverse separazioni mostrano tutte un'elevata attività soppressoria nei confronti della proliferazione dei linfociti T (dati non mostrati).

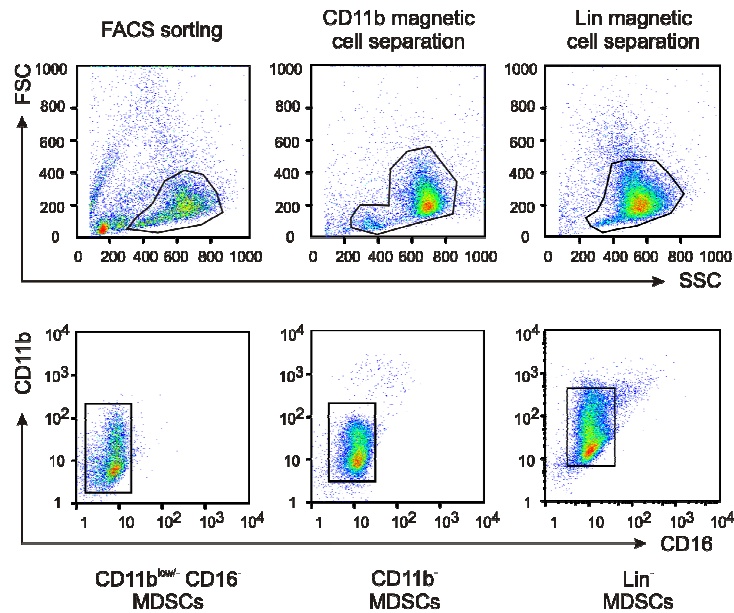


Figura 16

Metodi di separazione della sottopopolazione immunosoppressoria $CD16^-/CD11b^{low/-}$ contenuta nelle BM-MDSC.

Nella figura sono riportati i profili morfologici (in alto) e il profilo di espressione dei marcatori CD16 e CD11b della sottopopolazione immunosoppressoria $CD16^-/CD11b^{low/-}$ separata mediante *FACS sorting* e attraverso separazione immunomagnetica utilizzando le microbiglie per il CD11b ed il cocktail per i marcatori di *Lineage*.

Dopo aver dimostrato che le BM-MDSC sono in grado di ridurre l'espressione delle catene ζ ed ϵ del complesso recettoriale del CD3 abbiamo analizzato se anche la sottopopolazione immunosoppressoria $CD16^-/CD11b^{low/-}$ fosse in grado di indurre a diminuzione dell'espressione della catena ϵ del CD3. I PBMC sono stati marcati con il CFSE ed attivati con anticorpi anti-CD3/CD28 in presenza o meno della frazione Lin^- o Lin^+ ottenute dopo separazione immunomagnetica a partire dalle BM-MDSC. Dopo 4 giorni di coltura le cellule sono state raccolte e marcate con un anticorpo monoclonale diretto contro la catena di superficie CD3 ϵ . Come è possibile osservare

in Figura 17, la sottopopolazione Lin^- isolata dalle BM-MDSC è in grado di indurre una riduzione statisticamente significativa ($P = 0.014$) della catena ϵ del CD3 espressa sui linfociti T, contrariamente alla popolazione Lin^+ che è priva di attività soppressoria.

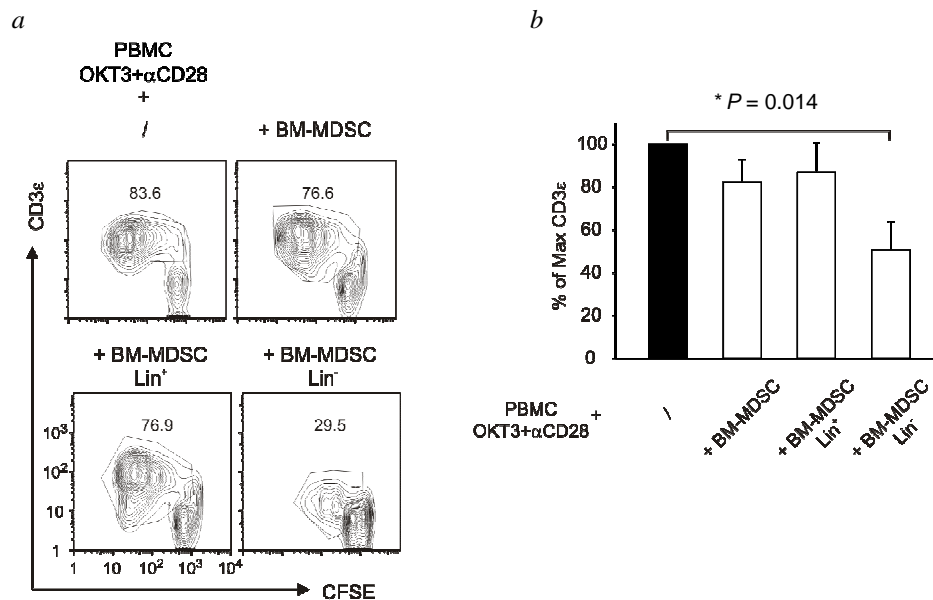


Figura 17

La sottopopolazione $\text{CD16}^{\text{low}}/\text{CD11b}^{\text{low}}$ isolata dalle BM-MDSC è in grado di indurre la riduzione dell'espressione della catena ϵ del CD3 espressa sui linfociti T.

Analisi della riduzione dell'intensità di fluorescenza media del CD3ε espresso sui linfociti T indotta dalla popolazione Lin^- isolata attraverso separazione immunomagnetica con microbiglie *Lineage*.

a. Esempio rappresentativo dell'analisi dell'espressione del CD3ε in PBMC CFSE^+ attivati con anti-CD3/CD28 in presenza o meno delle BM-MDSC o delle frazioni Lin^+ e Lin^- da esse isolate.

b. La riduzione del CD3ε indotta dalla frazione Lin^- delle BM-MDSC risulta essere statisticamente significativa ($P = 0.014$). Il grafico è rappresentativo di sei esperimenti indipendenti.

4.2.1 Caratterizzazione immunofenotipica della sottopopolazione immunosoppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-}

Per caratterizzare fenotipicamente la frazione CD16⁻/CD11b^{low/-} contenuta all'interno delle BM-MDSC, le cellule sono state marcate subito dopo separazione cellulare. Sono stati utilizzati anticorpi monoclonali diretti contro marcatori di *Lineage* (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), marcatori mieloidi (CD13, CD33), marcatori monocitari (CD14, HLA-DR), marcatori granulocitari (CD15, CD66b), marcatori di immaturità cellulare (CD34, CD117), marcatori di enzimi associati alla soppressione mediata dai linfociti T regolatori (CD39, CD73, marcatori di molecole di adesione (CD62L) e marcatori della famiglia delle molecole costimolatorie B7 (B7-H1, B7-H2, B7-H3) che sono coinvolte nella regolazione dell'immunità antitumorale ¹⁴³. Per evidenziare le caratteristiche fenotipiche esclusive delle cellule soppressorie abbiamo analizzato anche l'immunofenotipo della popolazione CD16⁻/CD11b^{low/-} isolata dal midollo *ex-vivo*. Analizzando i soli parametri morfologici di FSC (dimensioni cellulari) e di SSC (granulosità cellulare) abbiamo potuto osservare che le cellule appartenenti alla sottopopolazione CD16⁻/CD11b^{low/-} immunosoppressoria (Figura 18c, in verde) sono più grandi e meno granulose rispetto alle cellule appartenenti alla stessa frazione isolata *ex-vivo* (Figura 18c, in rosso). La diversa granulosità delle due frazioni analizzate è stata inoltre confermata dalla diversa espressione del CD66b che è considerato un marcatore dei granuli secondari ⁸¹⁻⁸². Come è possibile osservare in Figura 18, le cellule soppressorie CD16⁻/CD11b^{low/-} isolate dalle BM-MDSC risultano avere solo una debole espressione del CD66b (Figura 18a), diversamente dalla corrispondente frazione isolata dal midollo *ex-vivo* che, invece, esprime il CD66b a più alta intensità (Figura 18b). Analizzando l'espressione dei marcatori sopra elencati è possibile osservare che, all'interno delle CD16⁻/CD11b^{low/-} soppressorie, vi è la presenza di cellule parzialmente positive per i marcatori HLA-DR, CD34 e CD117, indicando quindi l'eterogeneità di questa popolazione cellulare. È infatti noto che questi marcatori sono coespressi sui mieloblasti ma differenzialmente espressi nei precursori monocitari (promonociti) e granulocitari (promielociti): infatti i promonociti sono CD34⁻/HLA-DR⁺/CD117⁻, i promielociti invece sono CD34⁻/HLA-DR⁻/CD117⁺ ¹⁴⁴. L'analisi dell'espressione del CD13 e del CD15 rivela, all'interno della sottopopolazione immunosoppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-}, la presenza di cellule

parzialmente positive per il CD13 e completamente positive per il CD15. A differenza dei marcatori HLA-DR, CD34 e CD117, CD13 e CD15 non sono marcatori in grado di identificare in modo univoco le cellule appartenenti al compartimento monocitario o a quello granulocitario: sia i precursori mieloidi del *lineage* monocitario che quelli del *lineage* granulocitario esprimono, infatti, tali marcatori, anche se con diverse intensità¹⁴⁴⁻¹⁴⁵.

Negli ultimi anni l'espressione di due enzimi, il CD39 ed il CD73, è stata osservata sulle cellule T regolatorie e quindi associata all'immunosoppressione²⁸. Entrambi gli enzimi sono coinvolti nella conversione dell'ATP extracellulare in adenosina, un potente regolatore negativo del sistema immunitario¹⁴⁶. Alla luce di queste informazioni abbiamo analizzato l'espressione di tali marcatori sulle BM-MDSC umane. L'analisi dell'espressione del CD39 e del CD73 mostra che le cellule CD16⁻/CD11b^{low/-} soppressorie esprimono il CD39 ma non il CD73. Queste osservazioni sono confermate anche da dati di letteratura che indicano che l'espressione del CD39 inizia nello stadio maturativo dei promielociti e promonociti e continua fino alla completa maturazione di granulociti e macrofagi; l'espressione del CD73 viene invece identificata solo a livello di macrofagi maturi (Clifford E. 1997, Pulte E. 2007). L'analisi dell'espressione delle molecole costimolatorie appartenenti alla famiglia B7 ha invece evidenziato l'assenza del B7-H1, B7-H2 e B7-H3 sulla superficie delle BM-MDSC.

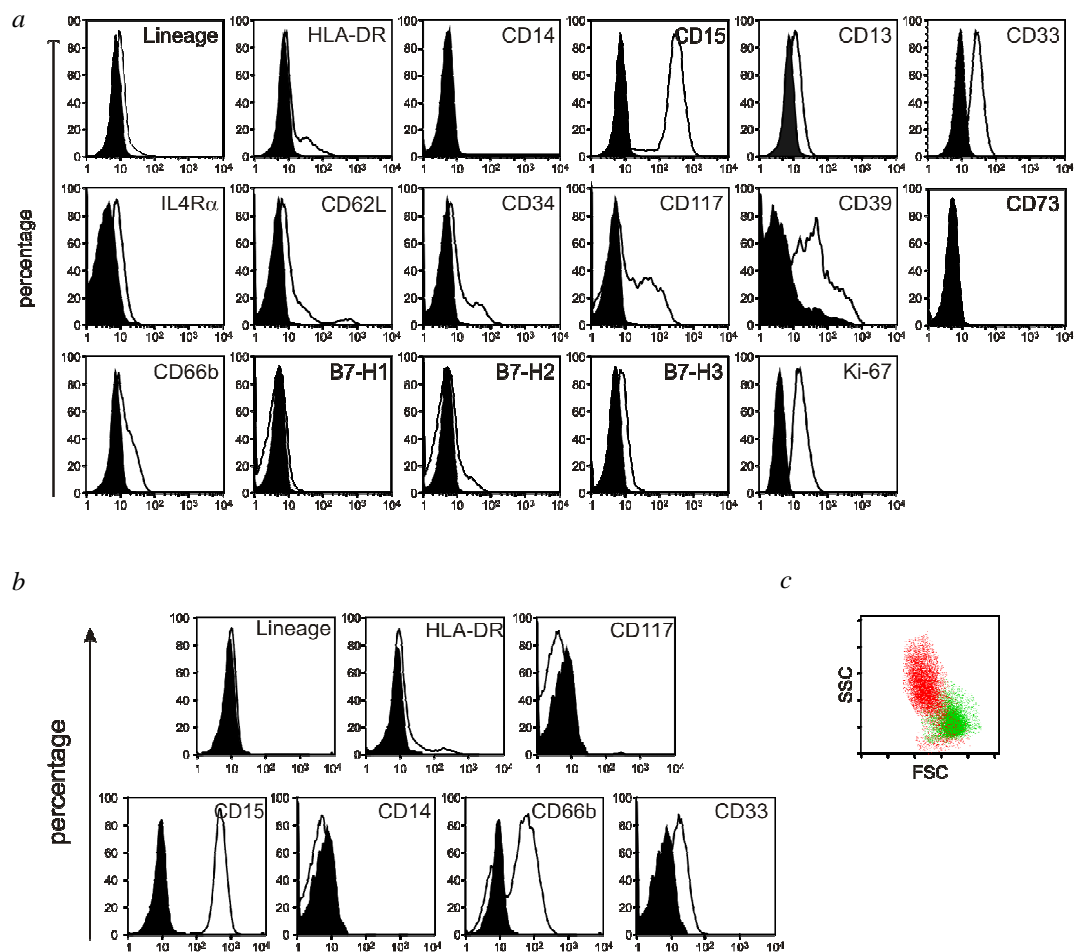


Figura 18

Analisi immunofenotipica della frazione CD16⁻/CD11b^{low/-} isolata dalle BM-MDSC o da midollo *ex-vivo*.

Espressione dei diversi marcatori utilizzati per la caratterizzazione fenotipica della sottopopolazione CD16⁻/CD11b^{low/-} isolata dalle BM-MDSC (a) o da midollo *ex-vivo* (b). La curva nera rappresenta il segnale di autofluorescenza delle cellule, la curva bianca rappresenta l'espressione del marcatore indicato. c. *Dot-plot* rappresentativo della diversa morfologia delle frazioni CD16⁻/CD11b^{low/-} isolate *ex-vivo* (in rosso) e dopo 4 giorni di coltura con la combinazione di G-CSF e GM-CSF (in verde).

4.2.2 Le cellule soppressorie CD16⁻/CD11b^{low/-} sono fluorescenti nella lunghezza d'onda del rosso

Tramite analisi citometrica abbiamo osservato che, diversamente dalle altre frazioni ottenute a partire dalle BM-MDSC, le cellule soppressorie CD16⁻/CD11b^{low/-} sono caratterizzate da un'emissione di fluorescenza nel rosso (FL3 $\lambda > 670$ nm e FL4 $\lambda = 661$ nm) come mostrato in Figura 19a. E' noto che le cellule mieloidi sono caratterizzate da un'aumentata autofluorescenza dovuta all'accumulo di alcune sostanze all'interno dei loro organelli citoplasmatici¹⁴⁷; in particolar modo NAD(P)H¹⁴⁸ e flavine¹⁴⁹ emettono nella lunghezza d'onda del verde (495-570 nm), mentre le porfirine¹⁵⁰⁻¹⁵³ e le lipofuscine¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ emettono nella lunghezza d'onda del rosso (630-760 nm). La fluorescenza delle cellule mieloidi risulta inoltre aumentata durante la differenziazione cellulare¹⁵⁷. Per determinare se questa aumentata fluorescenza potesse essere una caratteristica rilevante della sottopopolazione immunosoppressoria, abbiamo deciso di separare attraverso *FACS sorting* la sottopopolazione delle CD16⁻/CD11b^{low/-} più fluorescente nel rosso da quella meno fluorescente (Figura 19b). Per effettuare questa separazione, la frazione CD16⁻/CD11b^{low/-} è stata inizialmente isolata a partire dalle BM-MDSC, mediante separazione immunomagnetica utilizzando le biglie CD11b. Le frazioni ottenute da entrambe le separazioni cellulari hanno dimostrato avere una purezza di almeno il 95%.

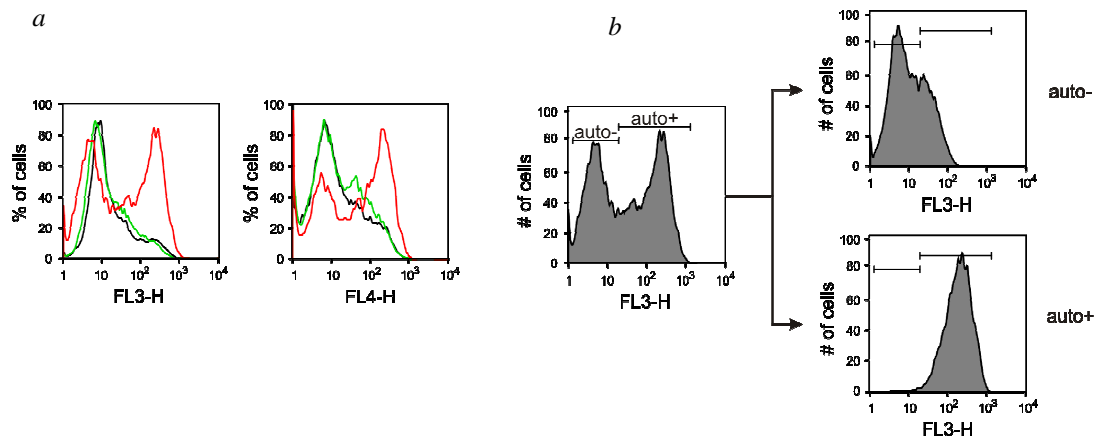


Figura 19

Le cellule CD16⁻/CD11b^{low/-} sono caratterizzate da un'aumentata emissione di fluorescenza nella lunghezza d'onda di emissione del rosso.

a. Esempio rappresentativo dell'aumento di emissione della fluorescenza nei canali FL3 ($\lambda > 670\text{nm}$) e FL4 ($\lambda = 661\text{nm}$). In nero è rappresentata l'autofluorescenza delle BM-MDSC, in verde l'autofluorescenza della frazione CD11b⁺ e in rosso la frazione CD11b⁻ (CD16⁻CD11b^{low/-}).

b. Esempio rappresentativo della separazione cellulare effettuata mediante *FACS sorting* delle cellule più fluorescenti (auto⁺) e di quelle meno autofluorescenti (auto⁻) della frazione CD16⁻/CD11b^{low/-}.

Successivamente abbiamo separato, mediante *sorting* con citofluorimetro, le cellule che emettono nel rosso da quelle non fluorescenti, e le abbiamo marcate con un pannello di anticorpi monoclonali comprendenti la maggior parte dei marcatori precedentemente utilizzati per la definizione del fenotipo della sottopopolazione CD16⁻/CD11b^{low/-}. L'analisi fenotipica delle due sottopopolazioni separate ha evidenziato, nella sottopopolazione non fluorescente, la presenza di cellule più immature (come si deduce dal rapporto nucleo/citoplasma elevato) e caratterizzate dalla parziale espressione di HLA-DR, CD34 e CD117 (Figura 20a). Nella frazione fluorescente invece non vi sono cellule CD34⁺, il CD117 è espresso solo debolmente e la maggior parte delle cellule è HLA-DR⁻ (Figura 20b). Un'altra differenza significativa che si può osservare tra le due frazioni è l'espressione del CD66b che, come precedentemente detto, è un marcatore dei granuli secondari delle cellule granulocitarie. La mancata espressione di questo marcatore nella frazione non fluorescente supporta l'idea che le cellule che compongono questa popolazione siano più immature, presumendo che le cellule più immature non abbiano ancora sintetizzato i granuli secondari. Per convalidare questa ipotesi, abbiamo marcato le due frazioni con l'anticorpo anti-MPO, un marcatore specifico dei granuli primari e

le abbiamo analizzate al microscopio confocale, così da visualizzare anche la struttura da cui proviene il segnale fluorescente (paragrafo 4.2.3).

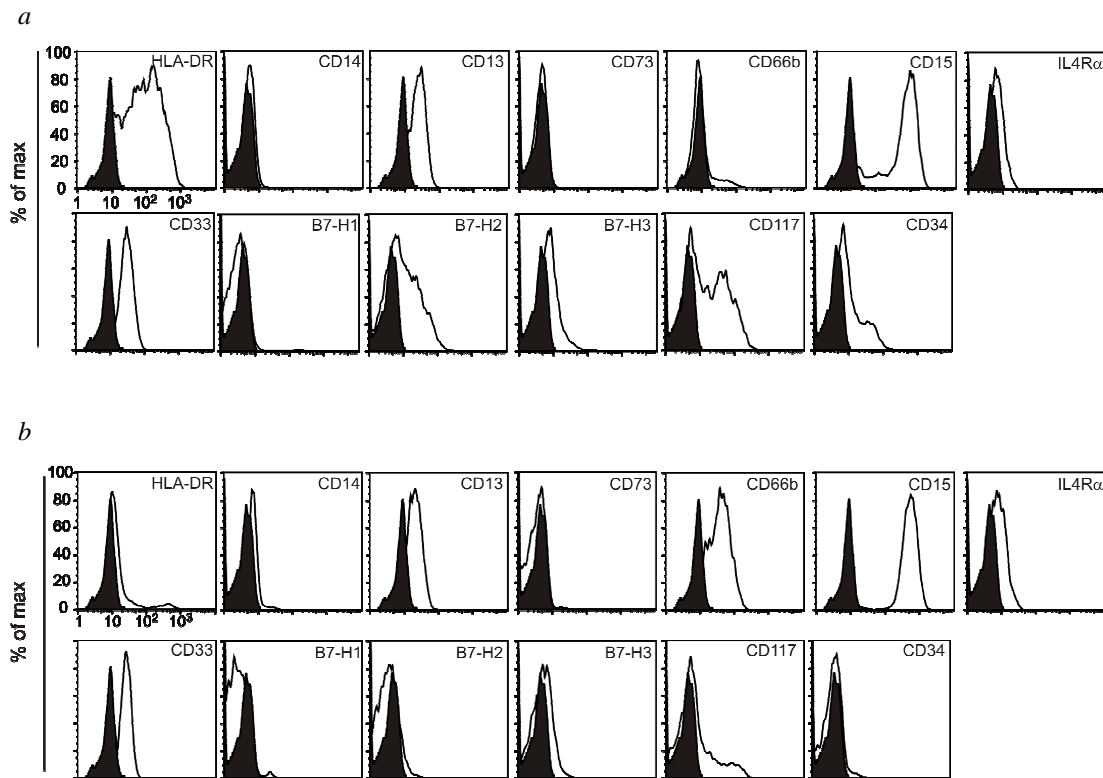


Figura 20

Caratterizzazione fenotipica delle sottopopolazioni a diversa fluorescenza nel rosso isolate dalle BM-MDSC CD16⁻/CD11b^{low/-}.

Profilo immunofenotipico effettuato, mediante l'analisi dell'espressione di alcuni marcatori, sulle frazioni non fluorescente (a) e fluorescente (b) nel rosso isolate dalla popolazione soppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-}. In nero è rappresentata l'autofluorescenza, in bianco è rappresentata l'espressione del marcatore indicato.

Per identificare se tra le due sottopopolazioni vi fosse una uguale o diversa attività soppressoria, le frazioni sortate sono state aggiunte a PBMC CFSE⁺ attivati con anticorpi monoclonali anti-CD3/CD28 in rapporto 1:1. Come controllo, ai PBMC attivati sono state aggiunte anche le BM-MDSC non separate e le frazioni CD11b⁺ e CD11b⁻ ottenute dalla prima separazione cellulare. Al 4° giorno di coltura le cellule sono state raccolte e marcate con un anticorpo monoclonale anti-CD3 e ne è stata analizzata la proliferazione attraverso citometria a flusso. Analizzando il profilo del CFSE, riportato in Figura 21a, è possibile osservare come la frazione meno fluorescente (CD11b⁻/auto⁻) sia in grado di indurre una soppressione

linfocitaria maggiore di quella osservata aggiungendo la frazione soppressoria CD11b⁻ (CD16⁻/CD11b^{low/-}). I dati da noi ottenuti dimostrano, quindi, che le cellule più immature sono dotate di una maggiore attività soppressoria, anche se non possiamo al momento, identificare un preciso stadio differenziativo. A supporto di questa osservazione vi è l'evidenza che la frazione più fluorescente (CD11b⁻/auto⁺), contenente cellule immature esprimenti marcatori di differenziazione non presenti sulle CD11b⁻/auto⁻, è anch'essa in grado di esercitare una ridotta attività soppressoria nei confronti dei linfociti T (Figura 21).

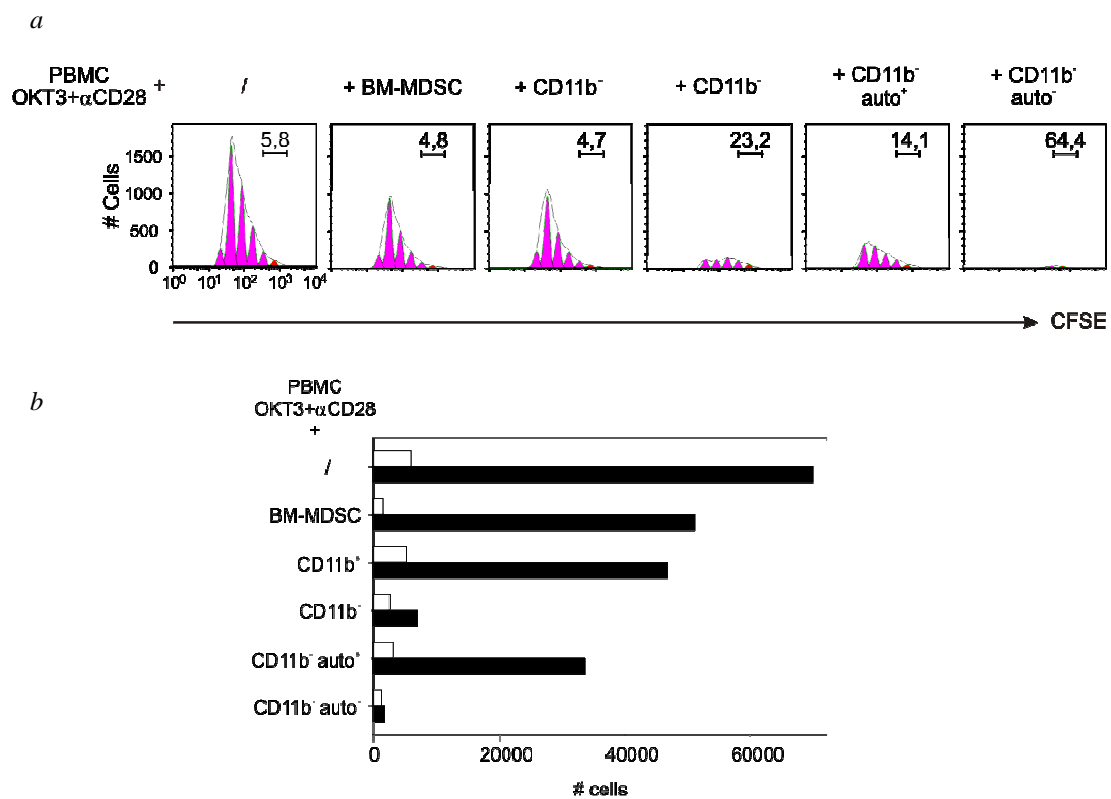


Figura 21

Analisi dell'attività soppressoria delle frazioni a diversa fluorescenza nel rosso isolate dalle BM-MDSC CD16⁻/CD11b^{low/-}.

a. Analisi della proliferazione dei linfociti T attivati con anti-CD3/CD28 a cui sono state aggiunte le BM-MDSC o le diverse sottopopolazioni cellulari separate da esse, CD11b⁺, CD11b⁻, CD11b⁻/auto⁺ e CD11b⁻/auto⁻. I valori indicati si riferiscono alla percentuale di linfociti T appartenenti alla generazione parentale.

b. Analisi quantitativa della proliferazione di PBMC CFSE⁺ attivati con anti-CD3/CD28 in presenza o meno delle BM-MDSC o delle diverse frazioni da esse isolate, aggiunte in un rapporto di 1:1. La proliferazione, analizzata dopo 4 giorni di coltura, è stata calcolata considerando il numero assoluto di eventi nelle popolazioni di linfociti T *resting* (barra bianca) o proliferanti (barra nera) analizzate nel gate CFSE⁺/CD3⁺. Il grafico mostra la media di due esperimenti indipendenti.

Abbiamo poi analizzato se anche la sottopopolazione $CD16^{-}/CD11b^{low}/auto^{-}$ altamente immunosoppressoria fosse in grado di indurre la diminuzione dell'IFN- γ prodotto dai linfociti T attivati. Per fare questo abbiamo raccolto i surnatanti di coltura dei PBMC attivati con anti-CD3/CD28 in presenza o meno delle sottopopolazioni delle BM-MDSC ed abbiamo poi analizzato la presenza della citochina tramite test ELISA. Come si può osservare in Figura 22, la popolazione $CD16^{-}/CD11b^{low}/auto^{-}$ è in grado di indurre una marcata riduzione dell'IFN- γ prodotto dai PBMC attivati. Questi risultati confermano che, come precedentemente osservato (vedi paragrafo 4.1.3), la diminuzione dell'IFN- γ prodotto dai linfociti T è associato al meccanismo di soppressione. L'attività immunosoppressoria mediata dalle BM-MDSC e dalle sue sottopopolazioni $CD16^{-}/CD11b^{low}$, $CD16^{-}/CD11b^{low}/auto^{-}$ e $CD16^{-}/CD11b^{low}/auto^{+}$, può quindi essere analizzata anche valutando la riduzione dell'IFN- γ secreto dai linfociti T attivati.

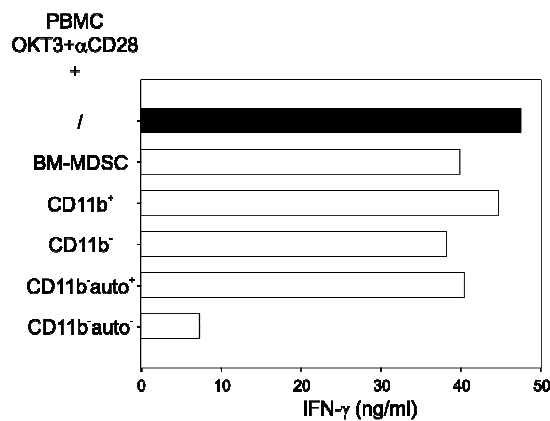


Figura 22

La popolazione $CD16^{-}/CD11b^{low}/auto^{-}$ è in grado di ridurre la produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T attivati con anti-CD3/CD28.

I surnatanti di coltura, raccolti al 4° giorno, sono stati testati in ELISA per analizzare il contenuto di IFN- γ . Il grafico è rappresentativo di un unico esperimento. La barra in nero rappresenta la produzione di IFN- γ dei PBMC attivati con anti-CD3/CD28, mentre in bianco sono rappresentati i PBMC attivati a cui sono state aggiunte le diverse popolazioni cellulari in rapporto 1:1.

4.2.3 Analisi in microscopia confocale dell'espressione di MPO e Arginasi I nella sottopopolazione immunosoppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-}

Molti studi dimostrano che le MDSC esprimono l'enzima Arg-I che, insieme a iNOS, sembra essere coinvolto nel meccanismo di immunosoppressione mediato da queste cellule ^{102,131,158}. Entrambi gli enzimi hanno come substrato l'L-arginina, un amminoacido essenziale per la funzionalità dei linfociti T ¹⁵⁹: la rimozione di tale amminoacido dal microambiente induce, nelle cellule T, la diminuzione della catena ζ del complesso recettoriale CD3 (vedi paragrafo 4.1.3) ed il blocco del ciclo cellulare in fase G0-G1 ¹⁶⁰. Entrambi questi fenomeni inducono un'alterata funzionalità delle cellule T ¹⁰⁷. Arg-I è costitutivamente espressa nei granulociti polimorfonucleati ¹⁶¹. Uno studio effettuato dal gruppo di Ochoa ha dimostrato, inoltre, la presenza di cellule CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺/Arg-I⁺, aventi caratteristiche morfologiche tipiche dei granulociti, in PBMC di pazienti affetti da carcinoma renale ⁸⁰; uno studio successivo ha evidenziato l'appartenenza di queste cellule ad una sottopopolazione di granulociti attivati CD66b⁺/VEGFR1⁺ in grado di rilasciare nel plasma l'Arg-I contenuta nei loro granuli citoplasmatici ⁸³. L'attività di Arg-I non è associata all'immunosoppressione solo in casi di infezione, malattie autoimmunitarie o neoplasie. La minor responsività dei linfociti T mediata da Arg-I è anche associata all'immunosoppressione della risposta immunitaria materna nei confronti del feto semi-allogeneo, indispensabile per la buona riuscita della gravidanza: la presenza di Arg-I è stata infatti rilevata sia nella placenta che nel sangue di donne in gravidanza ¹⁶².

In letteratura la localizzazione intracellulare di Arg-I nei PMN è molto discussa: secondo alcuni autori questo enzima è contenuto nei granuli terziari ¹⁶³, mentre secondo un altro gruppo Arg-I è contenuta all'interno dei granuli primari o azzurrofilii ¹⁶¹. Per quanto riguarda le cellule mieloidi mononucleate, la presenza di Arg-I è stata evidenziata nei monociti attivati di pazienti affetti da tubercolosi e infezione filariale ^{161,164-165} ma non nei monociti circolanti nel sangue di donatori sani ¹⁶¹. Per analizzare l'espressione e la localizzazione citoplasmatica di Arg-I abbiamo marcato le cellule CD16⁻/CD11b^{low/-}, sia isolate dalle BM-MDSC (Figura 23a) che isolate dal midollo *ex-vivo* (Figura 23c) con l'anticorpo monoclonale anti-Arg-I in associazione ad un anticorpo policlonale anti-mieloperossidasi (MPO), un enzima presente nei granuli primari dei PMN. La doppia colorazione Arg-I ed MPO permette

quindi di valutare se vi sia o meno la coespressione di questi due enzimi e quindi di valutare se Arg-I sia espressa nei granuli primari o meno. Le cellule sono poi state colorate anche con il DAPI per permettere la visualizzazione dei nuclei ed analizzate attraverso microscopia confocale. Come si può osservare in Figura 23a (in alto) in diversi esperimenti abbiamo osservato che la frazione $CD16^-/CD11b^{low/-}$ delle BM-MDSC presenta due diversi pattern di espressione di MPO: cellule con un grande nucleo e ridotto citoplasma presentano un'espressione diffusa di questo enzima, e cellule con un rapporto nucleo/citoplasma ridotto e caratterizzate dalla presenza di un numero discreto di granuli con espressione di MPO di tipo granulare. Come controllo, l'analisi dell'espressione dell'MPO è stata effettuata anche su granulociti e monociti maturi: osservando le immagini riportate in Figura 23b (in alto), si può notare che i granulociti maturi presentano una distribuzione granulare dell'MPO mentre, nei monociti, l'enzima si localizza nel citoplasma e, probabilmente, nei lisosomi, come descritto in letteratura ¹⁶⁶.

L'analisi dell'espressione di Arg-I nella frazione soppressoria $CD16^-/CD11b^{low/-}$ (Figura 23a, in basso) ha evidenziato la presenza di cellule con un diverso *pattern* di espressione: nella maggior parte delle cellule Arg-I risulta essere localizzata nei granuli primari che contengono MPO (colocalizzazione in giallo) mentre alcune cellule risultano essere negative per Arg-I. La stessa analisi effettuata sui PMN rivela una completa localizzazione di Arg-I e MPO mentre i monociti risultano negativi per Arg-I, in accordo con quanto osservato da Munder ¹⁶¹. L'analisi dell'espressione di Arg-I ha evidenziato che le frazioni $CD16^-/CD11b^{low/-}$, isolate sia dal midollo *ex-vivo* che dalle BM-MDSC, presentano entrambe una distribuzione granulare di Arg-I. Analizzando invece l'espressione dell'MPO abbiamo osservato che la frazione $CD16^-/CD11b^{low/-}$ isolata dal midollo *ex-vivo* presenta una minore espressione enzimatica rispetto alle cellule della stessa frazione isolata dalle BM-MDSC (Figura 23c). Per controllo, sono state sottoposte ad analisi anche le frazioni $CD16^-/CD11b^+$ e $CD16^+/CD11b^+$ isolate dal midollo *ex-vivo*: le cellule che compongono queste due sottopopolazioni appartengono a stadi maturativi più avanzati e presentano una progressiva espressione sia di Arg-I che di MPO (Figura 23c).

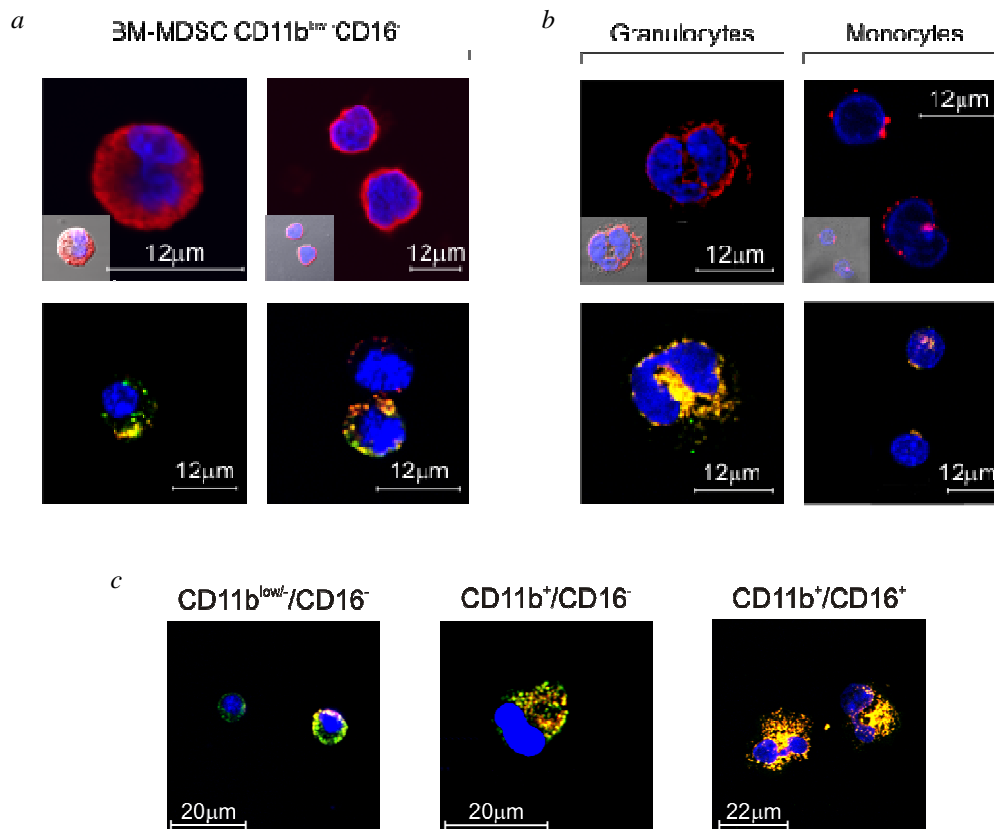


Figura 23

Analisi in microscopia confocale dell'espressione di Arginasi I e di MPO

Analisi in microscopia confocale effettuata sulla frazione immunosoppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-} (a), sui granulociti e monociti maturi (b) e sulle frazioni CD16⁻/CD11b^{low/-}, CD16⁻/CD11b⁺ e CD16⁺/CD11b⁺ isolate da midollo *ex-vivo* (c). Pannello in alto: blu = DAPI, rosso = MPO. Pannello in basso: blu = DAPI, rosso = MPO, verde = Arg-I, giallo = colocalizzazione di MPO e Arg-I.

A partire dalle osservazioni che la frazione soppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-} presenta un'aumentata espressione di MPO rispetto alla stessa frazione isolata *ex-vivo*, e che la stessa MPO può avere una distribuzione granulare o diffusa, abbiamo analizzato la morfologia e l'espressione di MPO nelle frazioni CD11b⁻/auto⁻ e CD11b⁻/auto⁺ isolate dalla frazione soppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-}. L'analisi da noi condotta ha messo in evidenza che, nella frazione più fluorescente, le cellule mostrano un rapporto nucleo-citoplasma ridotto ed hanno una distribuzione di MPO di tipo granulare (Figura 24b, pannello di sinistra, in verde); inoltre, è interessante notare che il segnale di autofluorescenza di questa popolazione si localizza esattamente nei granuli citoplasmatici (Figura 24b, pannello di sinistra, in rosso).

Nella frazione non fluorescente, invece, le cellule risultano avere un nucleo molto grande, poco citoplasma (come contrassegnato dalle frecce in Figura 24a, pannello di destra), nessuna granulazione visibile e un'espressione diffusa a livello citoplasmatico dell'MPO (Figura 24a, pannello di sinistra), caratteristiche che fanno supporre che queste cellule siano più immature rispetto alle precedenti e che non abbiano ancora iniziato la sintesi dei granuli primari.

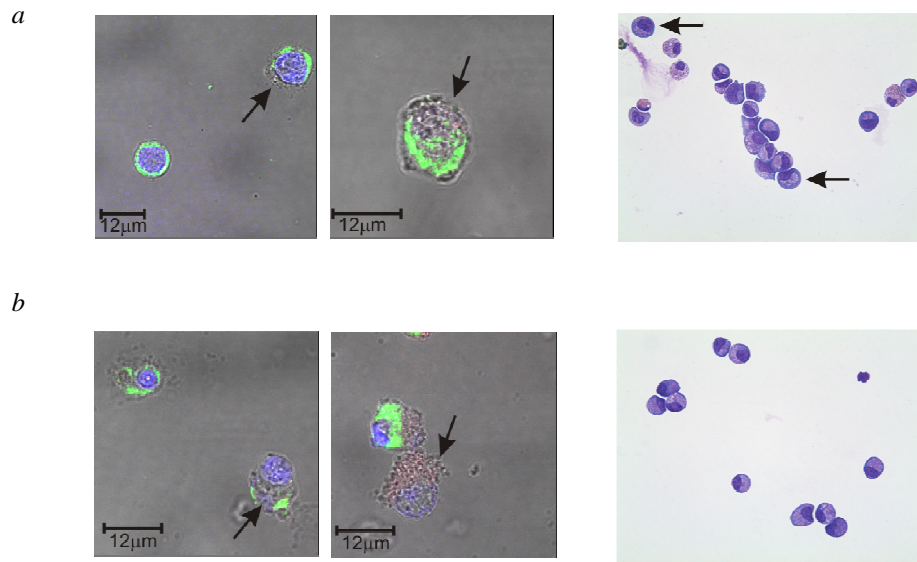


Figura 24

Analisi della morfologia e dell'espressione di MPO nelle frazioni a diversa fluorescenza nel rosso isolate dalle BM-MDSC CD16⁻/CD11b^{low/-}.

Analisi del segnale di fluorescenza e dell'espressione dell'MPO effettuata, mediante microscopia confocale, sulle frazioni CD11b⁻/auto⁻ (a) e CD11b⁻/auto⁺ (b) isolate dalle BM-MDSC. In blu sono rappresentati i nuclei colorati con DAPI, in verde è rappresentata l'MPO mentre in rosso, dove è presente, è rappresentata la fluorescenza nel rosso. Nel pannello di destra sono riportate le colorazioni Giemsa delle rispettive frazioni.

4.2.4 Caratterizzazione del tipo recettoriale dell'IL4Rα espresso dalla sottopopolazione immunosoppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-}

Partendo dalla considerazione che l'IL4Rα (CD124) è considerato un marcatore chiave per l'identificazione delle MDSC sia umane che murine^{73,89} abbiamo deciso di valutare il tipo di recettore presente sulla superficie delle CD16⁻/CD11b^{low/-} considerando il fatto che in letteratura è riportato che l'IL4Rα è coinvolto nella

formazione di due complessi recettoriali ¹⁶⁷. Questi due recettori sono definiti di tipo I e di tipo II a seconda del complesso recettoriale formato: il recettore di tipo I è costituito dall'associazione della catena γ del recettore dell'IL-2 (*common γ chain*, CD132) con l'IL4R α , mentre il recettore di tipo II è formato dall'associazione dell'IL4R α con la catena $\alpha 1$ del recettore dell'IL-13 (IL-13R $\alpha 1$, CD213a1). Il recettore di tipo II può legare sia IL-4 che IL-13 a differenza del recettore di tipo I che è in grado di legare solo l'IL-4 ¹⁶⁷. Per valutare il tipo di complesso recettoriale espresso dalla frazione immunosoppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-}, le cellule sono state marcate con anticorpi monoclonali anti-CD132, anti-IL4R α e anti-IL13R $\alpha 1$ ed analizzate poi attraverso microscopia confocale. Come si può osservare in Figura 25a, nelle cellule CD16⁻/CD11b^{low/-} il segnale dell'IL4R α è sovrapposto sia a quello del CD132 sia a quello dell'IL13R $\alpha 1$ (la colocalizzazione è identificabile dal colore giallo), dimostrando che le cellule soppressorie esprimono sia il complesso recettoriale di tipo I che quello di tipo II.

Il legame dell'IL-4 o dell'IL-13 ai propri recettori induce, nella cellula, la fosforilazione del fattore trascrizionale STAT6 che è associato alla sopravvivenza e alla proliferazione cellulare ¹⁶⁸⁻¹⁶⁹. Per determinare la funzionalità dei due tipi recettoriali espressi dalla frazione CD16⁻/CD11b^{low/-} abbiamo valutato la capacità dei recettori di trasdurre il segnale mediato dall'aggiunta di IL-4 o IL-13 alle cellule ed andando ad analizzare la fosforilazione di STAT6. A tal scopo le cellule sono state incubate per 15 minuti con 100ng/ml di IL-4 o di IL-13 o, come controllo, in assenza di entrambe le citochine. Alla fine del trattamento le cellule sono state raccolte ed è stata estratta la frazione proteica totale che è stata utilizzata per analizzare, mediante Western blot, la fosforilazione di STAT-6. In Figura 25b è riportato un Western blot che mostra la fosforilazione di STAT6 dopo trattamento con IL-4 o IL-13. Come controllo positivo e negativo della fosforilazione di STAT6 dopo trattamento con IL-4 o IL-13 sono state utilizzate rispettivamente una linea linfoblastoide trasformata con EBV, SICA-EBV, e la linea eritromieloblastoide K562. Il *Western blot* ha evidenziato che, nella frazione soppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-} delle BM-MDSC, il trattamento con IL-4 o IL-13 induce la fosforilazione di STAT6 dimostrando, quindi, la funzionalità di entrambi i tipi recettoriali espressi.

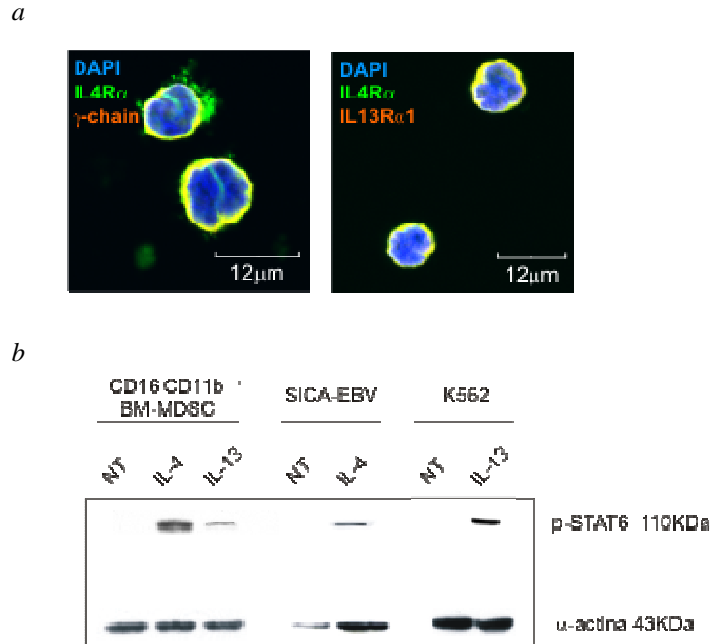


Figura 25

Analisi dell'espressione di IL4R α sulle cellule soppressorie CD16⁺/CD11b^{low/-} e saggio funzionale di trasduzione del segnale.

a. Analisi, in microscopia confocale, dell'espressione dei complessi recettoriali di tipo I e tipo II nella frazione CD16⁺/CD11b^{low/-}. Immagine di sinistra: analisi dell'espressione del recettore di tipo I. Blu = DAPI, verde = IL4R α , rosso = CD132, giallo = colocalizzazione tra IL4R α e CD132. Immagine di destra: analisi dell'espressione del recettore di tipo II. Blu = DAPI, verde = IL4R α , rosso = IL13R α 1, giallo = colocalizzazione tra IL4R α e IL13R α 1.

b. Analisi, mediante Western blot, della fosforilazione di STAT-6 dopo trattamento per 15 minuti con 100 ng/ml di IL-4 o IL-13. L'analisi è stata effettuata sulla frazione CD16⁺/CD11b^{low/-} isolata dalle BM-MDSC, sulle SICA-EBV e sulle K562.

4.3 Le BM-MDSC come possibile bersaglio terapeutico di farmaci chemioterapici

Numerosi studi effettuati sul modello murino hanno evidenziato che l'eliminazione delle MDSC può essere accompagnata da una regressione del tumore^{49-51,99,120,170}. Questa osservazione ha spinto la ricerca all'identificazione di metodi che consentano di eliminare in modo selettivo le MDSC. Le strategie utilizzate *in vivo* per depletare le MDSC consistono nell'utilizzo di agenti in grado di riconoscere tali cellule, ad esempio anticorpi, o agenti citotossici, come la *gemcitabina*^{51,121,171}. Alcuni agenti antitumorali, in aggiunta all'effetto citotossico diretto sulle cellule neoplastiche,

esercitano anche un'azione di attivazione sulle cellule del sistema immunitario inducendo una risposta antitumorale ¹⁷². All'interno di questa classe di farmaci il 5-FU è stato identificato come una molecola utile per la riduzione delle MDSC in alcuni modelli sperimentali di neoplasie murine ¹³⁰. Il 5-FU è un antimetabolita, analogo dell'uracile, che è in grado di distruggere il normale processamento dell'RNA di cellule altamente proliferanti semplicemente incorporandosi nel loro acido ribonucleico ¹⁷³.

4.3.1 Effetto del 5-FU sulle BM-MDSC generate *in vitro*

Prima di testare l'effetto del 5-FU sulle BM-MDSC da noi indotte *in vitro*, abbiamo effettuato un'analisi della proliferazione delle stesse BM-MDSC. A questo scopo, le cellule di midollo *ex-vivo* sono state marcate con il CFSE e coltivate con la combinazione di G-CSF e GM-CSF per la durata di 4 giorni. Ogni giorno della coltura, una parte delle cellule è stata raccolta e marcata con anticorpi monoclonali anti-CD16 e anti-CD11b in modo da associare al profilo maturativo delle cellule, il profilo di proliferazione attraverso l'analisi del CFSE. Come riportato in Figura 26, le BM-MDSC sono state analizzate considerando tre sottopopolazioni mieloidi: le CD11b^{high} (comprendenti cellule più mature), le CD11b^{int} (comprendenti cellule in uno stadio di immaturità intermedio) e le CD11b^{low/-} (comprendenti cellule altamente immature e soppressive). Attraverso l'analisi del profilo del CFSE durante i quattro giorni di coltura delle BM-MDSC, abbiamo potuto osservare che le cellule caratterizzate da un'elevata proliferazione sono contenute nelle frazioni CD11b^{int} (curva rossa) e CD11b^{low/-} (curva verde). Per verificare l'effetto del 5-FU sulla differenziazione delle BM-MDSC in coltura, abbiamo coltivato per 4 giorni le cellule del BM *ex-vivo* con la combinazione di G-CSF e GM-CSF in presenza o meno di diverse concentrazioni di farmaco. Le dosi del 5-FU sono state scelte dopo analisi di vitalità cellulare, effettuata attraverso la valutazione dell'espressione dei marcatori annessina V e 7AAD (7-Aminoactinomicina D, composto fluorescente in grado di legarsi ad alta affinità al DNA) in modo da scegliere un intervallo non tossico per queste cellule (dati non mostrati). Al 4° giorno di coltura le cellule sono state raccolte e marcate con anticorpi monoclonali anti-CD16 e anti-CD11b. Suddividendo le BM-MDSC nelle tre diverse sottopopolazioni sopra indicate (CD11b^{high}, CD11b^{int} e CD11b^{low/-}) abbiamo potuto osservare che, aggiungendo alla coltura del midollo il 5-

FU ad una concentrazione di 2.43 $\mu\text{g/ml}$, si ottiene una riduzione statisticamente significativa delle sottopopolazioni $\text{CD11b}^{\text{int}}$ ($P = 0.014$) e $\text{CD11b}^{\text{low/-}}$ ($P < 0.001$) anche se la riduzione sembra riguardare in modo più rilevante la frazione più soppressoria $\text{CD11b}^{\text{low/-}}$ (Figura 27b). Questi dati suggeriscono che le frazioni delle BM-MDSC con maggiore attività proliferativa sono anche quelle più sensibili all'azione del 5-FU.

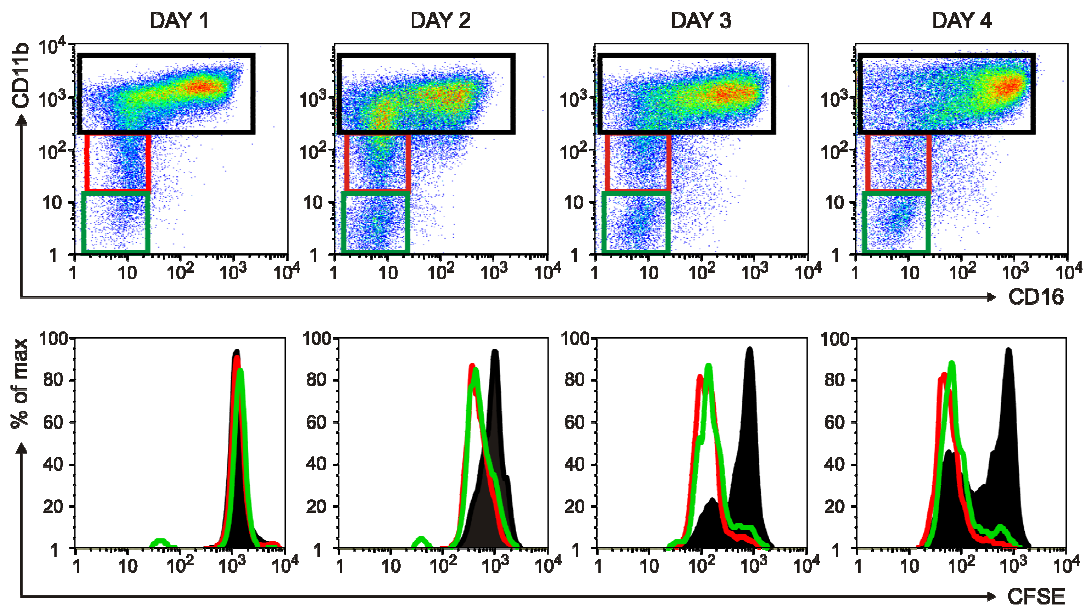


Figura 26

Analisi della proliferazione delle BM-MDSC.

Le cellule di BM *ex-vivo* sono state marcate con il CFSE e coltivate per 4 giorni con la combinazione di G-CSF e GM-CSF. Alla fine della coltura le cellule sono state marcate con anticorpi anti-CD16 e anti-CD11b. L'analisi della proliferazione cellulare è stata effettuata analizzando il segnale del CFSE in tre sottopopolazioni: $\text{CD11b}^{\text{high}}$, in nero, $\text{CD11b}^{\text{int}}$, in rosso, e $\text{CD11b}^{\text{low/-}}$, in verde.

Per valutare la capacità del 5-FU di eliminare l'attività soppressoria delle BM-MDSC, PBMC allogenei marcati con il CFSE sono stati attivati con anticorpi monoclonali anti-CD3/CD28 per quattro giorni in presenza o meno delle BM-MDSC generate *in vitro* con l'aggiunta delle diverse dosi di 5-FU. Come è possibile osservare in Figura 27c l'aggiunta del 5-FU è in grado di ripristinare in modo statisticamente significativo la proliferazione dei linfociti T attivati a cui sono state aggiunte le BM-MDSC generate *in vitro* in presenza di una dose di farmaco pari a 2.43 $\mu\text{g/ml}$ ($P = 0.029$).

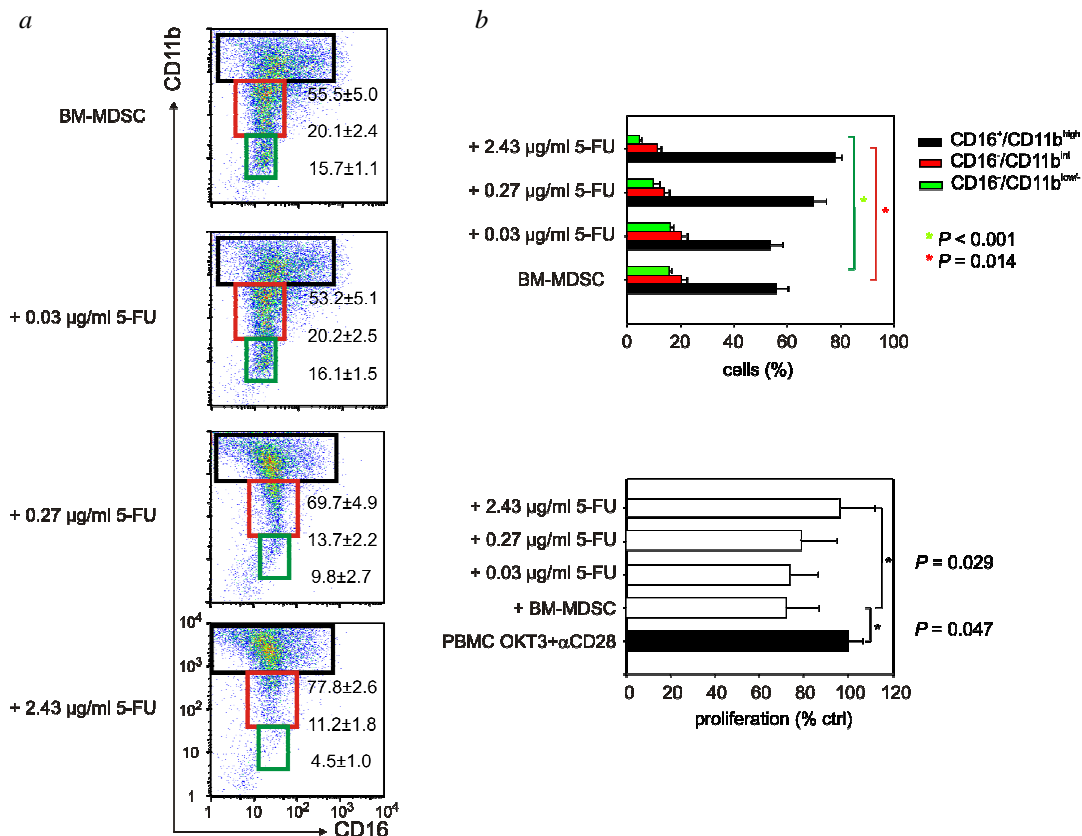


Figura 27

Il 5-FU elimina la frazione più immatura e soppressiva delle BM-MDSC e ne riduce significativamente l'attività soppressoria.

a. Profilo maturativo, secondo l'espressione dei marcatori CD16 e CD11b, delle BM-MDSC generate *in vitro* con la combinazione G-CSF e GM-CSF in presenza di diverse dosi di 5-FU. Per valutare l'effetto delle diverse dosi di farmaco sulle BM-MDSC, le cellule sono state analizzate suddividendo le cellule in tre sottopopolazioni: CD11b^{high}, in nero, CD11b^{dim}, in rosso, e CD11b^{low/-}. Il grafico è rappresentativo di 6 esperimenti indipendenti. A lato di ogni regione è riportato il valore della media e dell'errore standard.

b. Variazione delle sottopopolazioni CD11b^{high}, in nero, CD11b^{dim}, in rosso, e CD11b^{low/-} nei diversi campioni di BM-MDSC coltivati con le diverse dosi di 5-FU. La concentrazione di 2.43 µg/ml di 5-FU è in grado di ridurre in maniera statisticamente significativa la percentuale delle BM-MDSC contenute nelle sottopopolazioni CD11b^{dim} e CD11b^{low/-}. ($P = 0.014$ in rosso, $P < 0.001$ in verde). Il grafico è rappresentativo di 6 esperimenti indipendenti.

c. Effetto del 5-FU sul ripristino della proliferazione linfocitaria soppressa dalle BM-MDSC. La proliferazione dei linfociti T è stata calcolata considerando la percentuale di cellule CD3⁺CFSE⁺ rapportando poi al 100% il controllo di proliferazione.

Uno studio recente ha definito le MDSC umane come $\text{Lin}^{\text{low}/-}/\text{HLA-DR}^-/\text{CD11b}^+/\text{CD33}^+$ ⁹¹. Per determinare se la frazione immunosoppressoria delle BM-MDSC potesse avere tale fenotipo, abbiamo marcato le BM-MDSC in presenza di diverse dosi di 5-FU al 4° giorno di coltura con anticorpi monoclonali diretti contro i marcatori di Lin, HLA-DR, CD11b e CD33 (Figura 28).

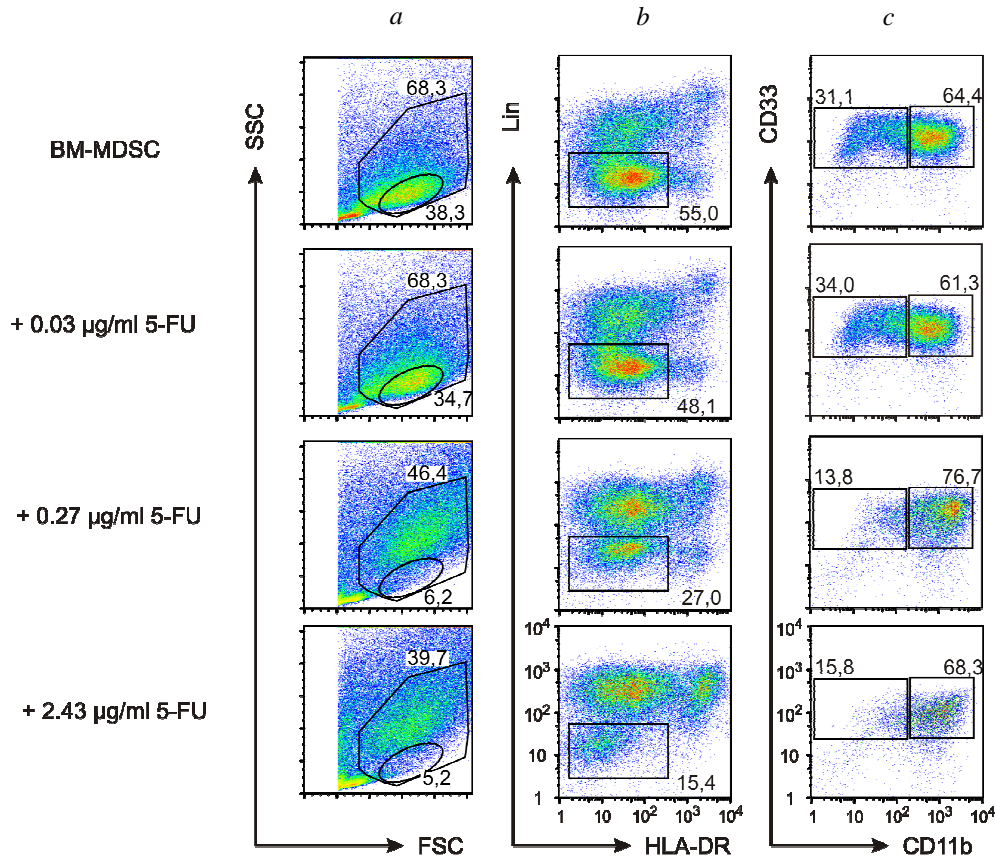


Figura 28

Analisi immunofenotipica dell'espressione dei marcatori di Lin, HLA-DR, CD11b e CD33 nelle BM-MDSC generate *in vitro* in presenza di diverse dosi di 5-FU.

a. Profilo morfologico delle BM-MDSC secondo i parametri FSC (dimensione cellulare) e SSC (granulosità cellulare). Sono rappresentati due *gate*: uno più grande che comprende tutte le cellule mieloidi (*gate mieloidi*), ed uno più piccolo comprendente solo le cellule a basso SSC. A lato sono riportati i valori percentuali delle cellule appartenenti a tali regioni. L'aggiunta del 5-FU induce una progressiva riduzione della percentuale delle cellule nella regione a basso SSC.

b. Profilo di espressione dei marcatori di Lin e HLA-DR all'interno del *gate mieloidi*. L'aggiunta del 5-FU induce una progressiva riduzione della percentuale di cellule $\text{Lin}^{\text{low}}/\text{HLA-DR}^{\text{low}}$. A lato sono riportati i valori percentuali di tale popolazione.

c. Profilo di espressione dei marcatori CD11b e CD33 nella regione $\text{Lin}^-/\text{HLA-DR}^{\text{low}/-}$. L'aggiunta del farmaco induce una progressiva riduzione della percentuale di cellule $\text{CD11b}^{\text{low}}/\text{CD33}^+$. A lato sono riportati i valori percentuali delle due regioni $\text{CD11b}^{\text{low}/-}$ e $\text{CD11b}^{\text{high}}$.

Utilizzando tale pannello di marcatori abbiamo potuto osservare che l'aggiunta del 5-FU induce la riduzione statisticamente significativa delle cellule a basso SSC, Lin^- , $\text{Lin}^-/\text{HLA-DR}^-$ e $\text{Lin}^-/\text{HLA-DR}^{\text{low}/-}/\text{CD11b}^{\text{low}/-}/\text{CD33}^+$ (Figura 29).

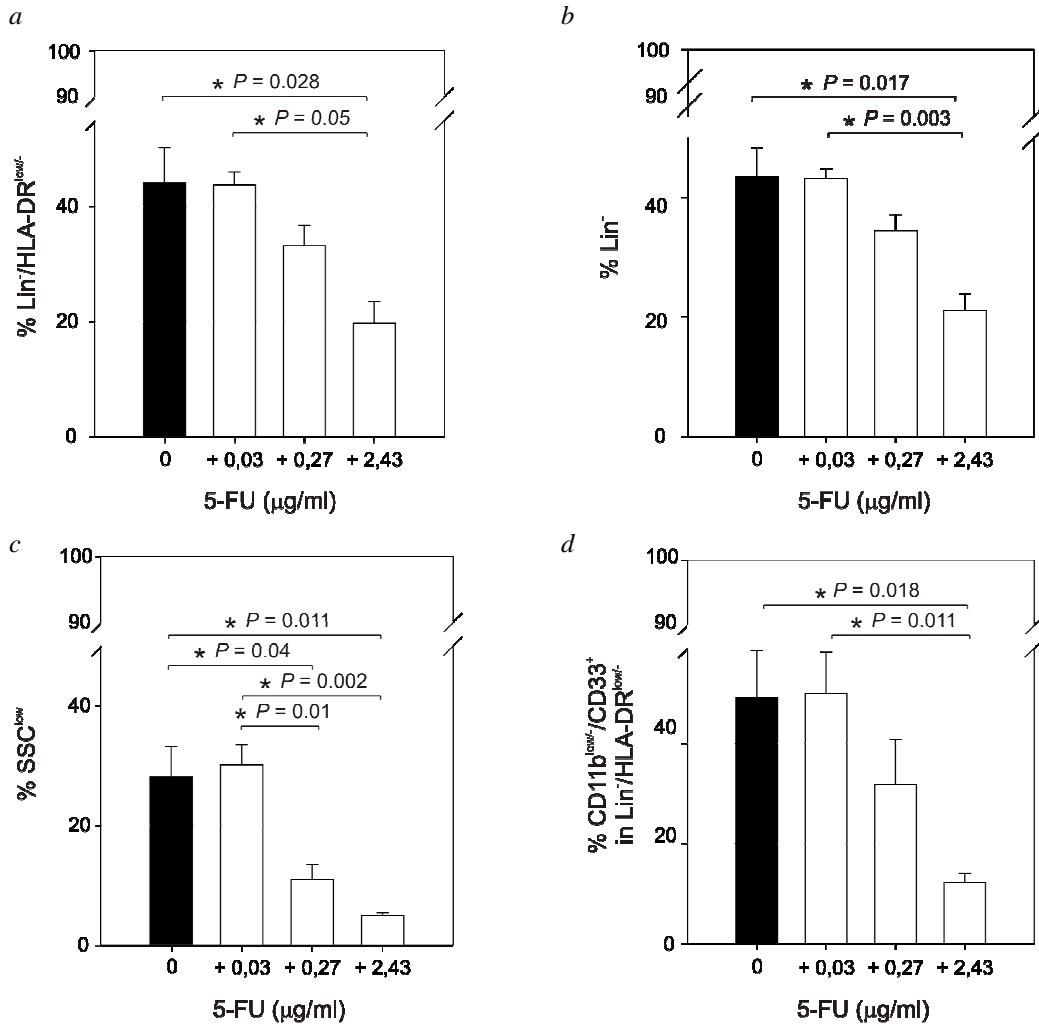


Figura 29

L'aggiunta del 5-FU induce la riduzione statisticamente significativa delle cellule $\text{Lin}^-/\text{HLA-DR}^{\text{low}/-}/\text{CD11b}^{\text{low}/-}/\text{CD33}^+$ caratterizzate da basso SSC.

Riduzione delle cellule $\text{Lin}^-/\text{HLA-DR}^{\text{low}/-}$ (a), Lin^- (b), SSC^{low} (c) o $\text{Lin}^-/\text{HLA-DR}^{\text{low}/-}/\text{CD11b}^{\text{low}/-}/\text{CD33}^+$ (d) indotta dall'aggiunta di diverse dosi di 5-FU. La barra nera rappresenta le BM-MDSC generate *in vitro* in assenza del farmaco; le barre bianche invece si riferiscono alle BM-MDSC generate *in vitro* in presenza di diverse dosi di 5-FU. I grafici si riferiscono a 3 esperimenti indipendenti. I valori della significatività statistica (P) sono indicati.

I dati sperimentali da noi ottenuti dimostrano quindi che il 5-FU, somministrato in basse dosi, è in grado di eliminare la sottopopolazione delle BM-MDSC responsabile dell'attività immunosoppressoria. Inoltre, abbiamo osservato che tali cellule presentano caratteristiche immunofenotipiche simili alle MDSC identificate nel sangue di pazienti affetti da tumori solidi ⁹¹. Queste osservazioni suggeriscono il possibile utilizzo del 5-FU con lo scopo di incrementare l'efficacia delle terapie immunoterapiche che, spesso, risultano essere limitate dall'immunosoppressione associata ai tumori.

5. DISCUSSIONE

La tolleranza immunitaria è fondamentale per evitare il riconoscimento degli antigeni *self* e per prevenire le malattie autoimmunitarie. Le cellule tumorali, in virtù della loro natura *self*, sono in grado di evadere il riconoscimento del sistema immunitario e sono in grado di indurre l'accumulo delle cellule deputate al mantenimento della tolleranza immunitaria. Una di queste popolazioni tolerogeniche è rappresentata dalle MDSC, una popolazione eterogenea di cellule comprendenti progenitori mieloidi e cellule mieloidi immature⁴⁷⁻⁴⁸.

Le MDSC sono state identificate sia in diversi modelli di neoplasia murina che in pazienti affetti da tumore. Nel topo diversi studi hanno dimostrato la presenza di due sottopopolazioni di MDSC, una a caratteristiche monocitarie (CD11b⁺ LY6G⁻ LY6C^{high}) ed una a caratteristiche granulocitarie (CD11b⁺ LY6G⁺ LY6C^{low}), dotate entrambe della capacità di inibire la proliferazione linfocitaria, anche se attraverso meccanismi diversi^{75-76,174-175}. Nell'uomo, invece, le caratteristiche immunofenotipiche delle MDSC non sono ancora state definite in modo univoco e diversi autori hanno definito questa popolazione con un insieme di marcatori mieloidi, a volte non sovrapponibili. Infatti, studi condotti su pazienti affetti da tumore hanno evidenziato l'espansione di cellule ad attività soppressoria talvolta caratterizzate con marcatori monocitari e talvolta con marcatori granulocitari^{73,79-80,85,88-90}.

Si è ipotizzato che l'espansione delle MDSC sia influenzata da diversi fattori solubili che, rilasciati dal tumore, inducono l'aumento della mielopoiesi a livello del midollo osseo ed un contemporaneo blocco maturativo delle cellule mieloidi. Le cellule mieloidi immature fuoriescono poi dal midollo osseo per accumularsi nel sito tumorale, negli organi linfoidi secondari e nella circolazione sistemica dove esercitano un'azione soppressoria nei confronti dei linfociti T impedendo, così, lo sviluppo di un'efficace risposta antitumorale⁴⁷. Attraverso lo sviluppo di un sistema di coltura *in vitro* abbiamo dimostrato che è possibile indurre l'espansione di cellule a capacità soppressoria (BM-MDSC) a partire da cellule di aspirato midollare coltivate in presenza di diversi fattori di crescita, tra i quali G-CSF, GM-CSF, IL-6 o la loro combinazione. Queste citochine, rilasciate durante i processi infiammatori e neoplastici, sono coinvolte nel reclutamento, nella proliferazione e maturazione dei

precursori granulocitari e monocitari. Numerosi studi hanno messo in evidenza il ruolo del G-CSF e del GM-CSF nel promuovere la progressione tumorale, nonostante essi siano utilizzati anche negli approcci di terapia anti-tumorale; è stato inoltre osservato che alti livelli di IL-6 sono spesso associati ad una cattiva prognosi della malattia ¹³⁵. I dati da noi ottenuti dimostrano che il trattamento dei precursori mieloidi con G-CSF, GM-CSF, IL-6 o la combinazione di tali citochine sono in grado di indurre la proliferazione e l'espansione dei progenitori mieloidi immaturi dotati di attività soppressoria, a differenza dei campioni coltivati in assenza dei fattori di crescita che risultano essere costituiti da cellule più mature e prive di attività soppressoria. Uno studio da noi condotto su sangue periferico di pazienti affetti da melanoma e carcinoma del colon ha evidenziato l'espansione di cellule IL4R α ⁺ ad attività soppressoria, sia nel compartimento monocitario (CD14⁺) che in quello granulocitario (CD15⁺) ⁸⁹. Analizzando le cellule midollari coltivate *in vitro* in presenza delle sopra citate citochine, abbiamo osservato un'espansione di cellule mieloidi IL4R α ⁺ con caratteristiche fenotipiche simili a quelle osservate nel sangue di pazienti affetti da melanoma o carcinoma del colon ⁸⁹. G-CSF e GM-CSF inducono anche l'espressione del fattore trascrizionale c\EBP β , un regolatore chiave della granulopoiesi di emergenza ⁶⁸. In uno studio da noi recentemente pubblicato è stato dimostrato che questo fattore trascrizionale ha un ruolo chiave nell'induzione e nell'espansione *in vitro* delle BM-MDSC ⁶⁹. c\EBP β è legato alla cascata di trasduzione del segnale mediato da STAT3, un altro fattore trascrizionale che è ritenuto coinvolto nell'induzione del blocco differenziativo dei precursori mieloidi ⁶⁵. Questi dati suggeriscono quindi che c\EBP β e STAT3 siano coinvolti nell'induzione del blocco maturativo delle cellule mieloidi e, quindi, nell'induzione del fenotipo immunosoppressorio delle MDSC.

Nel modello murino è stato dimostrato che l'uso combinato di GM-CSF e di IL-6 risulta essere la combinazione citochinica migliore per l'induzione *in vitro* delle MDSC ⁶⁹. Analizzando il terreno di coltura delle BM-MDSC, generate utilizzando la combinazione di G-CSF+GM-CSF, abbiamo dimostrato la presenza di una quantità di IL-6 simile a quella aggiunta nel mezzo di coltura con GM-CSF, permettendo di considerare comparabili i due trattamenti.

La soppressione della proliferazione linfocitaria mediata dalle MDSC è spesso associata alla diminuzione della produzione di IFN- γ prodotto dai linfociti T attivati

80,83,88,122 ed alla riduzione dell'espressione delle catene ζ ^{103-104,139,176} ed ϵ ¹⁴⁰⁻¹⁴¹ del complesso recettoriale CD3 espresso sugli stessi linfociti T. La riduzione della catena ζ del CD3 è associata al metabolismo dell'L-arginina, un amminoacido essenziale per la proliferazione linfocitaria. Questo amminoacido è anche il substrato di Arg-I e iNOS, due enzimi coinvolti nel meccanismo di immunosoppressione mediato dalle MDSC: l'attivazione di questi enzimi, infatti, comporta la riduzione dell'L-arginina dal microambiente tumorale e la conseguente diminuzione della catena ζ del CD3 espresso sui linfociti T. Numerosi studi hanno inoltre dimostrato che la diminuzione dell'espressione delle catene ζ ed ϵ del CD3 induce anergia dei linfociti T e, in alcuni casi, anche l'apoptosi^{103-104,139,176}. I dati sperimentali da noi ottenuti dimostrano che la soppressione linfocitaria mediata dalle BM-MDSC è associata non solo alla diminuzione di IFN- γ secreto dai linfociti T attivati, ma anche alla riduzione dell'espressione delle catene ζ ed ϵ del CD3 espresso sugli stessi linfociti T.

Le caratteristiche più salienti delle MDSC sono sempre state considerate l'imaturità e la loro eterogeneità. Già nel 2001 era stata ipotizzata l'imaturità delle MDSC sulla base della mancanza di espressione di marcatori specifici di cellule mature, tra le quali i linfociti T, B e NK, monociti, granulociti e cellule dendritiche⁷⁹. Con questo lavoro abbiamo dimostrato che le BM-MDSC sono cellule immature appartenenti ad uno stadio di differenziazione ben preciso. Confrontando diverse sottopopolazioni isolate sia da midollo *ex-vivo* che dalle BM-MDSC abbiamo identificato nella frazione CD16⁻/CD11b^{low/-} delle BM-MDSC la sottopopolazione dotata di attività soppressoria. Le cellule appartenenti a questa frazione presentano caratteristiche morfologiche simili ai promielociti isolati dal midollo *ex-vivo* ma, a differenza di questi, sono più grandi, meno granulose e dotate della capacità di sopprimere la proliferazione linfocitaria. Abbiamo inoltre osservato che la soppressione esercitata da tale popolazione è associata alla riduzione dell'espressione della catena ϵ del CD3 espresso sui linfociti T. Per analizzare la minore granulosità della sottopopolazione soppressoria delle BM-MDSC abbiamo valutato l'espressione dei marcatori dei diversi granuli contenuti nel citoplasma delle cellule mieloidi del compartimento granulocitario. Le cellule granulocitarie sono infatti caratterizzate da tre tipi di granuli (primari, secondari e terziari), che vengono espressi a seconda dello stadio maturativo in cui si trovano le cellule stesse¹⁷⁷. Mediante l'analisi dell'espressione di marcatori dei granuli primari (MPO) e secondari (CD66b) abbiamo dimostrato che le cellule CD16⁻/CD11b^{low/-} isolate dalle BM-MDSC sono

meno granulose rispetto alle cellule CD16⁻/CD11b^{low/-} isolate da midollo *ex-vivo*: dal confronto delle due popolazioni è infatti emerso che la frazione soppressoria presenta una minore espressione del CD66b ed una maggiore espressione di MPO rispetto alle cellule isolate *ex-vivo*. Le cellule appartenenti alla sottopopolazione soppressoria risultano quindi avere un maggior contenuto di granuli primari ed un minor contenuto di granuli secondari a differenza delle cellule isolate *ex-vivo* e, per questo motivo, risultano essere in uno stadio di maggiore immaturità.

Arg-I è un enzima associato alla soppressione esercitata dalle BM-MDSC e, in letteratura, la localizzazione citoplasmatica di tale enzima è stata riportata nei granuli primari ¹⁶¹ o nei granuli terziari ¹⁶³. In questo lavoro abbiamo dimostrato che la frazione soppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-} presenta una distribuzione granulare di Arg-I e che tale enzima, è localizzato prevalentemente nei granuli primari, in accordo con le osservazioni effettuate da Munder ¹⁶¹.

Dall'analisi immunofenotipica della frazione CD16⁻/CD11b^{low/-} delle BM-MDSC è emersa la presenza di più di una sottopopolazione, dato che questa frazione è parzialmente positiva per i marcatori HLA-DR, CD34 e CD117, antigeni coespressi sui mieloblasti ma differenzialmente espressi sui promonociti (CD34⁻/HLA-DR⁺/CD117) e promielociti (CD34⁻/HLA-DR⁻/CD117⁺) ¹⁴⁴.

Negli ultimi anni è stata evidenziata una relazione tra l'espressione di due enzimi, il CD39 ed il CD73, con l'attività soppressoria mediata dalle cellule T regolatorie ²⁸. Entrambi gli enzimi sono coinvolti nella conversione dell'ATP extracellulare in adenosina, un potente regolatore negativo del sistema immunitario ¹⁴⁶. Analizzando l'espressione del CD39 ed del CD73 sulle BM-MDSC abbiamo osservato che la popolazione soppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-} è caratterizzata dalla sola espressione del CD39 ma non del CD73. I dati in nostro possesso sono attualmente insufficienti per ipotizzare un coinvolgimento del CD39 nel meccanismo di soppressione mediato dalle BM-MDSC poichè l'aggiunta di un inibitore di tale enzima non ha permesso di ripristinare a proliferazione dei linfociti T coltivati in presenza delle BM-MDSC (dati non mostrati).

Durante il processo di differenziazione, le cellule mieloidi sono caratterizzate da un'aumento dell'autofluorescenza ¹⁵⁷, fenomeno dovuto a particolari molecole che si accumulano all'interno dei granuli citoplasmatici ¹⁴⁷. Alcune di queste molecole, tra le quali il NAD(P)H ¹⁴⁸ e le flavine ¹⁴⁹, sono responsabili dell'aumento della fluorescenza nelle lunghezze d'onda del verde (495-570 nm); le porfirine ¹⁵⁰⁻¹⁵³ e le

lipofuscine¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ sono invece responsabili dell'aumento della fluorescenza nelle lunghezze d'onda del rosso (630-760 nm). Analizzando la frazione soppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-} abbiamo osservato un'aumentata fluorescenza nelle lunghezze d'onda tipiche del rosso, fenomeno che non si osserva invece nelle altre frazioni delle BM-MDSC. Separando le CD16⁻/CD11b^{low/-} soppressorie in base al diverso segnale di fluorescenza nel rosso, abbiamo identificato nelle cellule non fluorescenti (CD16⁻/CD11b^{low/-}/auto⁻) la sottopopolazione delle BM-MDSC caratterizzata dalla maggiore attività soppressoria. L'analisi dell'espressione di alcuni marcatori mieloidi ci ha permesso di evidenziare la maggiore immaturità delle cellule appartenenti alla frazione CD16⁻/CD11b^{low/-}/auto⁻ rispetto a quelle più fluorescenti. Le cellule non fluorescenti hanno un rapporto nucleo/citoplasma elevato e sono caratterizzate dalla parziale espressione di HLA-DR, CD34 e CD117, mentre le cellule fluorescenti, dotate di una minore attività soppressoria, esprimono debolmente il CD117 ma non presentano positività né per il CD34, né per l'HLA-DR. La diversa espressione del CD66b tra la frazione fluorescente (CD66b⁺) e la frazione non fluorescente (CD66b⁻) ci ha spinto a supporre che le cellule più immature non abbiano ancora sintetizzato i granuli secondari. A favore di questa ipotesi, vi è l'osservazione che le cellule soppressorie CD16⁻/CD11b^{low/-} presentano due diversi *pattern* di espressione della mieloperossidasi (MPO), enzima caratteristico dei granuli primari: mentre le cellule caratterizzate da un nucleo grande e da un ridotto citoplasma privo di granulazioni presentano una distribuzione citoplasmatica e diffusa dell'MPO, le cellule caratterizzate da un rapporto nucleo/citoplasma minore hanno un'espressione granulare dell'enzima che si localizza nelle granulazioni citoplasmatiche ben visibili. Queste osservazioni confermano che queste cellule possono essere collocate nello stadio maturativo dei promielociti, dato che la comparsa dei granuli primari è caratteristica della transizione dai mieloblasti ai promielociti¹⁷⁷. Analizzando le sottopopolazioni caratterizzate da diversa fluorescenza nelle lunghezze d'onda del rosso abbiamo evidenziato che l'MPO è presente in entrambe le frazioni anche se con una diversa distribuzione: le cellule fluorescenti hanno l'enzima localizzato nelle granulazioni citoplasmatiche ben visibili, mentre le cellule non fluorescenti presentano una distribuzione diffusa dell'enzima. Questo dato delimita quindi in modo molto preciso gli stadi maturativi della frazione soppressoria delle BM-MDSC che vanno dallo stadio immediatamente precedente alla formazione dei granuli primari a quello precedente la formazione dei granuli secondari.

L'IL4R α , marcatore delle MDSC sia umane che murine ⁷³, è coinvolto nella formazione di due complessi recettoriali: il tipo I, formato dall'IL4R α e dalla catena γ del recettore dell'IL-2, è in grado di legare solo l'IL-4; il tipo II, formato dall'IL4R α e dalla catena $\alpha 1$ del recettore dell'IL-13, è in grado di legare sia l'IL-4 che l'IL-13. La caratterizzazione fenotipica delle cellule soppressorie CD16⁻/CD11b^{low/-} ha evidenziato la presenza di entrambi i complessi recettoriali che, in presenza di IL-4 o IL-13, si sono dimostrati essere in grado di mediare la fosforilazione di STAT6, fattore trascrizionale coinvolto nella trasduzione del segnale di entrambe le citochine. Queste osservazioni, insieme alle evidenze sperimentali riportate in letteratura che attribuiscono a IL-4 e IL-13 un ruolo chiave nell'induzione del fenotipo soppressorio delle MDSC ^{49,97,178-179} suggeriscono il coinvolgimento di entrambe le citochine nell'attivazione del meccanismo soppressorio delle BM-MDSC.

Negli ultimi anni è risultato evidente che l'immunosoppressione associata ai tumori non solo facilita la progressione tumorale ma è anche uno dei fattori principali che limitano l'efficacia dell'immunoterapia. È quindi ovvio che la ricerca clinica e traslazionale si sia mossa nella direzione di associare l'immunoterapia a strategie terapeutiche in grado di bloccare i meccanismi di immunosoppressione ¹¹⁹. In effetti, già da molti anni è stato evidenziato che alcuni protocolli di immunoterapia associata alla chemioterapia (chemioimmunoterapia) hanno mostrato dei significativi vantaggi terapeutici rispetto alle due modalità di terapia separate ¹⁸⁰⁻¹⁸³. Recentemente uno studio condotto sul modello murino ha identificato nel 5-FU, un chemioterapico in grado di incorporarsi nell'RNA come analogo dell'uracile, un possibile approccio terapeutico per eliminare le MDSC ¹³⁰. Aggiungendo tale farmaco alle colture delle cellule midollari in presenza di G-CSF+GM-CSF abbiamo dimostrato che basse dosi di 5-FU sono in grado di eliminare la frazione soppressoria delle BM-MDSC. Dall'analisi immunofenotipica abbiamo potuto evidenziare che il 5-FU induce l'eliminazione della frazione soppressoria CD16⁻/CD11b^{low/-}, probabilmente a causa della maggiore capacità proliferativa di tali cellule ¹⁸⁴. Abbiamo inoltre dimostrato che le cellule CD16⁻/CD11b^{low/-} sensibili all'effetto del farmaco sono caratterizzate da una minore granulosità e dal fenotipo Lin⁻/HLA-DR^{low/-}/CD11b^{low/-}/CD33⁺. Cellule caratterizzate da un fenotipo simile sono state identificate anche nel sangue di pazienti affetti da tumore ed è stato inoltre dimostrato che i livelli delle MDSC, definite mediante questo fenotipo, correlano con la gravità della malattia ⁹¹. Queste

osservazioni ci permettono di suggerire che la chemioterapia, ed in particolar modo l'utilizzo del 5-FU a basse dosi, possa essere impiegato come adiuvante nei trattamenti immunoterapici in quanto in grado di eliminare una delle principali popolazioni responsabili dell'immunosoppressione associata ai tumori. Inoltre, le osservazioni emerse da questo studio, in aggiunta a dati non ancora pubblicati¹⁸⁴ che dimostrano che i livelli delle cellule Lin⁻/HLA-DR⁻/CD11b⁺/CD33⁺ correlano sia con la ridotta sopravvivenza dei pazienti che con la prognosi della malattia, suggeriscono il possibile uso prognostico della valutazione dei livelli delle cellule Lin⁻/HLA-DR⁻ in pazienti affetti da tumore.

BIBLIOGRAFIA

1. Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* **22**, 329-360 (2004).
2. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991-998 (2002).
3. Prehn, R.T. & Main, J.M. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* **18**, 769-778 (1957).
4. Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* **13**, 1-27 (1970).
5. Rygaard, J. & Povlsen, C.O. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* **82**, 99-106 (1974).
6. Stutman, O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* **183**, 534-536 (1974).
7. Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J. & Schreiber, R.D. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* **1**, 447-456 (1994).
8. Street, S.E., Cretney, E. & Smyth, M.J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* **97**, 192-197 (2001).
9. van den Broek, M.E., *et al.* Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* **184**, 1781-1790 (1996).
10. Smyth, M.J., *et al.* Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* **192**, 755-760 (2000).
11. Smyth, M.J., *et al.* Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* **191**, 661-668 (2000).

12. Shinkai, Y., *et al.* RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-867 (1992).
13. Shankaran, V., *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107-1111 (2001).
14. Swann, J.B. & Smyth, M.J. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* **117**, 1137-1146 (2007).
15. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**, 1-14 (2007).
16. Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* **5**, 263-274 (2005).
17. Stewart, T.J. & Abrams, S.I. How tumours escape mass destruction. *Oncogene* **27**, 5894-5903 (2008).
18. Nishikawa, H. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* **127**, 759-767 (2010).
19. Wing, K. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* **11**, 7-13 (2010).
20. Vignali, D.A., Collison, L.W. & Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* **8**, 523-532 (2008).
21. Kim, J.M., Rasmussen, J.P. & Rudensky, A.Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* **8**, 191-197 (2007).
22. Lahl, K., *et al.* Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* **204**, 57-63 (2007).
23. Hawrylowicz, C.M. & O'Garra, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* **5**, 271-283 (2005).

24. Joetham, A., *et al.* Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol* **178**, 1433-1442 (2007).
25. Collison, L.W., *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566-569 (2007).
26. Grossman, W.J., *et al.* Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* **104**, 2840-2848 (2004).
27. Cao, X., *et al.* Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* **27**, 635-646 (2007).
28. Borsellino, G., *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**, 1225-1232 (2007).
29. Deaglio, S., *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* **204**, 1257-1265 (2007).
30. Kobie, J.J., *et al.* T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* **177**, 6780-6786 (2006).
31. Berzofsky, J.A. & Terabe, M. NKT cells in tumor immunity: opposing subsets define a new immunoregulatory axis. *J Immunol* **180**, 3627-3635 (2008).
32. Terabe, M. & Berzofsky, J.A. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* **101**, 277-348 (2008).
33. Hegde, S., Fox, L., Wang, X. & Gumperz, J.E. Autoreactive natural killer T cells: promoting immune protection and immune tolerance through varied interactions with myeloid antigen-presenting cells. *Immunology* **130**, 471-483 (2010).

34. Bendelac, A. & Medzhitov, R. Adjuvants of immunity: harnessing innate immunity to promote adaptive immunity. *J Exp Med* **195**, F19-23 (2002).
35. Mantovani, A. & Sica, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* **22**, 231-237 (2010).
36. Sica, A., *et al.* Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* **18**, 349-355 (2008).
37. Porta, C., *et al.* Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* **214**, 761-777 (2009).
38. Biswas, S.K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, 889-896 (2010).
39. Bacchetta, R., Gregori, S. & Roncarolo, M.G. CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun Rev* **4**, 491-496 (2005).
40. Ghiringhelli, F., *et al.* Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* **202**, 919-929 (2005).
41. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Functional roles of immature dendritic cells in impaired immunity of solid tumour and their targeted strategies for provoking tumour immunity. *Clin Exp Immunol* **146**, 189-196 (2006).
42. Strober, S. Natural suppressor (NS) cells, neonatal tolerance, and total lymphoid irradiation: exploring obscure relationships. *Annu Rev Immunol* **2**, 219-237 (1984).
43. Maier, T., Holda, J.H. & Claman, H.N. Natural suppressor cells. *Prog Clin Biol Res* **288**, 235-244 (1989).
44. Pak, A.S., *et al.* Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* **1**, 95-103 (1995).

45. Young, M.R. & Wright, M.A. Myelopoiesis-associated immune suppressor cells in mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumors: gamma interferon plus tumor necrosis factor alpha synergistically reduces immune suppressor and tumor growth-promoting activities of bone marrow cells and diminishes tumor recurrence and metastasis. *Cancer Res* **52**, 6335-6340 (1992).
46. Gabrilovich, D.I., *et al.* The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* **67**, 425; author reply 426 (2007).
47. Gabrilovich, D.I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162-174 (2009).
48. Peranzoni, E., *et al.* Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* **22**, 238-244 (2010).
49. Sinha, P., Clements, V.K. & Ostrand-Rosenberg, S. Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res* **65**, 11743-11751 (2005).
50. Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., Albelda, S.M. & Ostrand-Rosenberg, S. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* **179**, 977-983 (2007).
51. Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A.S., Kaiser, L.R. & Albelda, S.M. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1⁺/CD11b⁺ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* **11**, 6713-6721 (2005).
52. Liu, C., *et al.* Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood* **109**, 4336-4342 (2007).
53. Nausch, N., Galani, I.E., Schlecker, E. & Cerwenka, A. Mononuclear myeloid-derived "suppressor" cells express RAE-1 and activate natural killer cells. *Blood* **112**, 4080-4089 (2008).

54. Terabe, M., *et al.* A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J Exp Med* **202**, 1627-1633 (2005).
55. De Santo, C., *et al.* Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. *J Clin Invest* **118**, 4036-4048 (2008).
56. Veltman, J.D., *et al.* COX-2 inhibition improves immunotherapy and is associated with decreased numbers of myeloid-derived suppressor cells in mesothelioma. Celecoxib influences MDSC function. *BMC Cancer* **10**, 464 (2010).
57. Pan, P.Y., *et al.* Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* **111**, 219-228 (2008).
58. Sinha, P., Clements, V.K., Fulton, A.M. & Ostrand-Rosenberg, S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* **67**, 4507-4513 (2007).
59. Serafini, P., *et al.* High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* **64**, 6337-6343 (2004).
60. Bunt, S.K., *et al.* Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res* **67**, 10019-10026 (2007).
61. van Crujisen, H., *et al.* Defective differentiation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in advanced cancer patients is not normalized by tyrosine kinase inhibition of the vascular endothelial growth factor receptor. *Clin Dev Immunol* **2007**, 17315 (2007).
62. Fricke, I., *et al.* Vascular endothelial growth factor-trap overcomes defects in dendritic cell differentiation but does not improve antigen-specific immune responses. *Clin Cancer Res* **13**, 4840-4848 (2007).

63. Nefedova, Y., *et al.* Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* **67**, 11021-11028 (2007).
64. Cheng, P., *et al.* Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med* **205**, 2235-2249 (2008).
65. Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* **9**, 798-809 (2009).
66. Sinha, P., *et al.* Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* **181**, 4666-4675 (2008).
67. Zhang, H., *et al.* STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood* **116**, 2462-2471 (2010).
68. Hirai, H., *et al.* C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* **7**, 732-739 (2006).
69. Marigo, I., *et al.* Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* **32**, 790-802 (2010).
70. Xiang, X., *et al.* Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int J Cancer* **124**, 2621-2633 (2009).
71. Chalmin, F., *et al.* Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* **120**, 457-471 (2010).
72. Abusamra, A.J., *et al.* Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* **35**, 169-173 (2005).
73. Gallina, G., *et al.* Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest* **116**, 2777-2790 (2006).

74. Ribechini, E., Greifenberg, V., Sandwick, S. & Lutz, M.B. Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Med Microbiol Immunol* **199**, 273-281 (2010).
75. Movahedi, K., *et al.* Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* **111**, 4233-4244 (2008).
76. Youn, J.I., Nagaraj, S., Collazo, M. & Gabrilovich, D.I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* **181**, 5791-5802 (2008).
77. Umemura, N., *et al.* Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J Leukoc Biol* **83**, 1136-1144 (2008).
78. Youn, J.I. & Gabrilovich, D.I. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* **40**, 2969-2975 (2010).
79. Almand, B., *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* **166**, 678-689 (2001).
80. Zea, A.H., *et al.* Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* **65**, 3044-3048 (2005).
81. Ducker, T.P. & Skubitz, K.M. Subcellular localization of CD66, CD67, and NCA in human neutrophils. *J Leukoc Biol* **52**, 11-16 (1992).
82. Simard, J.C., Girard, D. & Tessier, P.A. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* **87**, 905-914 (2010).

83. Rodriguez, P.C., *et al.* Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res* **69**, 1553-1560 (2009).
84. Brandau, S., *et al.* Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *J Leukoc Biol* (2010).
85. Filipazzi, P., *et al.* 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**, 2546-2553 (2007).
86. Vuk-Pavlovic, S., *et al.* Immunosuppressive CD14+HLA-DR^{low}/- monocytes in prostate cancer. *Prostate* **70**, 443-455 (2010).
87. Serafini, P., *et al.* Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* **203**, 2691-2702 (2006).
88. Hoechst, B., *et al.* A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* **135**, 234-243 (2008).
89. Mandruzzato, S., *et al.* IL4R α + myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol* **182**, 6562-6568 (2009).
90. Kusmartsev, S., *et al.* Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **14**, 8270-8278 (2008).
91. Diaz-Montero, C.M., *et al.* Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 49-59 (2009).

92. Liu, C.Y., *et al.* Population alterations of L: -arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b(+)/CD14 (-)/CD15 (+)/CD33 (+) myeloid-derived suppressor cells and CD8 (+) T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* (2009).
93. Nagaraj, S., *et al.* Anti-inflammatory triterpenoid blocks immune suppressive function of MDSCs and improves immune response in cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 1812-1823 (2010).
94. Delano, M.J., *et al.* MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)/CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* **204**, 1463-1474 (2007).
95. Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D.I. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol* **174**, 4880-4891 (2005).
96. Kusmartsev, S., Nagaraj, S. & Gabrilovich, D.I. Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol* **175**, 4583-4592 (2005).
97. Bronte, V., *et al.* IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* **170**, 270-278 (2003).
98. Rutschman, R., *et al.* Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol* **166**, 2173-2177 (2001).
99. Terabe, M., *et al.* 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**, 1741-1752 (2003).
100. Bronte, V. & Mocellin, S. Suppressive influences in the immune response to cancer. *J Immunother* **32**, 1-11 (2009).
101. Corzo, C.A., *et al.* Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* **182**, 5693-5701 (2009).

102. Rodriguez, P.C. & Ochoa, A.C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* **222**, 180-191 (2008).
103. Baniyash, M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* **4**, 675-687 (2004).
104. Ezernitchi, A.V., *et al.* TCR zeta down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs. *J Immunol* **177**, 4763-4772 (2006).
105. Nagaraj, S., *et al.* Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* **13**, 828-835 (2007).
106. Mantovani, G., *et al.* Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. *J Mol Med* **81**, 664-673 (2003).
107. Grohmann, U. & Bronte, V. Control of immune response by amino acid metabolism. *Immunol Rev* **236**, 243-264 (2010).
108. Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* **59**, 1593-1600 (2010).
109. Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P. & Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res* **70**, 68-77 (2010).
110. Hanson, E.M., Clements, V.K., Sinha, P., Ilkovitch, D. & Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **183**, 937-944 (2009).

111. Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B. & Lewis, C.E. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**, 618-631 (2008).
112. Yang, L., *et al.* Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* **13**, 23-35 (2008).
113. Du, R., *et al.* HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* **13**, 206-220 (2008).
114. Kujawski, M., *et al.* Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* **118**, 3367-3377 (2008).
115. DeNardo, D.G., *et al.* CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* **16**, 91-102 (2009).
116. Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H. & Maru, Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* **8**, 1369-1375 (2006).
117. Huysentruyt, L.C., Mukherjee, P., Banerjee, D., Shelton, L.M. & Seyfried, T.N. Metastatic cancer cells with macrophage properties: evidence from a new murine tumor model. *Int J Cancer* **123**, 73-84 (2008).
118. Pawelek, J.M. & Chakraborty, A.K. Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis. *Nat Rev Cancer* **8**, 377-386 (2008).
119. Nagaraj, S. & Gabrilovich, D.I. Myeloid-derived suppressor cells in human cancer. *Cancer J* **16**, 348-353 (2010).
120. Mirza, N., *et al.* All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res* **66**, 9299-9307 (2006).

121. Ko, H.J., *et al.* A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer Res* **67**, 7477-7486 (2007).
122. Ko, J.S., *et al.* Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* **15**, 2148-2157 (2009).
123. Ozao-Choy, J., *et al.* The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res* **69**, 2514-2522 (2009).
124. Xin, H., *et al.* Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* **69**, 2506-2513 (2009).
125. Rodriguez, P.C., *et al.* Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* **202**, 931-939 (2005).
126. Talmadge, J.E., *et al.* Chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibition reduces immature myeloid suppressor cell expansion. *Int Immunopharmacol* **7**, 140-151 (2007).
127. Gao, S.P., *et al.* Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest* **117**, 3846-3856 (2007).
128. Yu, H., Kortylewski, M. & Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* **7**, 41-51 (2007).
129. De Santo, C., *et al.* Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4185-4190 (2005).

130. Vincent, J., *et al.* 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* **70**, 3052-3061 (2010).
131. Dolcetti, L., *et al.* Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation. *Cancer Lett* **267**, 216-225 (2008).
132. Stetler-Stevenson, M., *et al.* Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* **98**, 979-987 (2001).
133. Elghetany, M.T., Ge, Y., Patel, J., Martinez, J. & Uhrova, H. Flow cytometric study of neutrophilic granulopoiesis in normal bone marrow using an expanded panel of antibodies: correlation with morphologic assessments. *J Clin Lab Anal* **18**, 36-41 (2004).
134. Kishimoto, T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* **22**, 347-352 (2010).
135. Ara, T. & Declerck, Y.A. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer* **46**, 1223-1231 (2010).
136. Shojaei, F., *et al.* Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol* **25**, 911-920 (2007).
137. Kishimoto, T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* **23**, 1-21 (2005).
138. Rapaport, M.H. & Bresee, C. Serial mitogen-stimulated cytokine production from continuously ill patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **35**, 428-434 (2010).
139. Takahashi, A., *et al.* Elevated caspase-3 activity in peripheral blood T cells coexists with increased degree of T-cell apoptosis and down-regulation of TCR zeta molecules in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* **7**, 74-80 (2001).

140. Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Meneses-Flores, M., Morales-Fuentes, J. & Lopez-Gonzalez, J.S. Lung carcinomas do not induce T-cell apoptosis via the Fas/Fas ligand pathway but down-regulate CD3 epsilon expression. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 325-336 (2008).
141. Riccobon, A., *et al.* Immunosuppression in renal cancer: differential expression of signal transduction molecules in tumor-infiltrating, near-tumor tissue, and peripheral blood lymphocytes. *Cancer Invest* **22**, 871-877 (2004).
142. Kuang, D.M., *et al.* Tumor-educated tolerogenic dendritic cells induce CD3epsilon down-regulation and apoptosis of T cells through oxygen-dependent pathways. *J Immunol* **181**, 3089-3098 (2008).
143. Flies, D.B. & Chen, L. The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity. *J Immunother* **30**, 251-260 (2007).
144. van Lochem, E.G., *et al.* Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom* **60**, 1-13 (2004).
145. Wood, B. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis. *Methods Cell Biol* **75**, 559-576 (2004).
146. Stagg, J. & Smyth, M.J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* **29**, 5346-5358 (2010).
147. Mitchell, A.J., *et al.* Technical advance: autofluorescence as a tool for myeloid cell analysis. *J Leukoc Biol* **88**, 597-603 (2010).
148. Mayevsky, A. & Rogatsky, G.G. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C615-640 (2007).
149. Thorell, B. Flow-cytometric monitoring of intracellular flavins simultaneously with NAD(P)H levels. *Cytometry* **4**, 61-65 (1983).

150. Cripps, D.J., Hawgood, R.S. & Magnus, I.A. Iodine tungsten fluorescence microscopy for porphyrin fluorescence. A study on erythropoietic protoporphyria. *Arch Dermatol* **93**, 129-137 (1966).
151. Cripps, D.J. & Peters, H.A. Fluorescing erythrocytes and porphyrin screening tests on urine, stool, and blood. Investigation of photosensitivity. *Arch Dermatol* **96**, 712-720 (1967).
152. Czitober, H., Schnack, H. & Wewalka, F. [Fluorescence microscopy demonstration of porphyrins in bone tissue in porphyria cutanea tarda. Comparative in vivo studies on liver function tests, liver histology and porphyrin excretion]. *Dtsch Med Wochenschr* **92**, 1761-1767 (1967).
153. Kiefer, C.R., *et al.* Porphyrin loading of lipofuscin granules in inflamed striated muscle. *Am J Pathol* **153**, 703-708 (1998).
154. Hamperl, H. [Behavior of liver pigments, lipofuscin and ceroid especially in hepatitis]. *Schweiz Z Pathol Bakteriol* **16**, 399-403 (1953).
155. Graham, C.E. Lipofuscin: identification and localization in monkey uterus. *Am J Obstet Gynecol* **102**, 490-492 (1968).
156. Eldred, G.E., Miller, G.V., Stark, W.S. & Feeney-Burns, L. Lipofuscin: resolution of discrepant fluorescence data. *Science* **216**, 757-759 (1982).
157. Monici, M., *et al.* Dependence of leukemic cell autofluorescence patterns on the degree of differentiation. *Photochem Photobiol Sci* **2**, 981-987 (2003).
158. Bronte, V. & Zanovello, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* **5**, 641-654 (2005).
159. Ochoa, A.C., Zea, A.H., Hernandez, C. & Rodriguez, P.C. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**, 721s-726s (2007).
160. Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G. & Ochoa, A.C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* **109**, 1568-1573 (2007).

161. Munder, M., *et al.* Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* **105**, 2549-2556 (2005).
162. Kropf, P., *et al.* Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur J Immunol* **37**, 935-945 (2007).
163. Jacobsen, L.C., Theilgaard-Monch, K., Christensen, E.I. & Borregaard, N. Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. *Blood* **109**, 3084-3087 (2007).
164. Munder, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* **158**, 638-651 (2009).
165. Babu, S., Kumaraswami, V. & Nutman, T.B. Alternatively activated and immunoregulatory monocytes in human filarial infections. *J Infect Dis* **199**, 1827-1837 (2009).
166. Bunbury, A., Potalicchio, I., Maitra, R. & Santambrogio, L. Functional analysis of monocyte MHC class II compartments. *FASEB J* **23**, 164-171 (2009).
167. LaPorte, S.L., *et al.* Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell* **132**, 259-272 (2008).
168. Fritz, D.K., Kerr, C., Botelho, F., Stampfli, M. & Richards, C.D. Oncostatin M (OSM) primes IL-13- and IL-4-induced eotaxin responses in fibroblasts: regulation of the type-II IL-4 receptor chains IL-4Ralpha and IL-13Ralpha1. *Exp Cell Res* **315**, 3486-3499 (2009).
169. Mullings, R.E., *et al.* Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol* **108**, 832-838 (2001).
170. Kusmartsev, S., *et al.* All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res* **63**, 4441-4449 (2003).

171. Kao, J., *et al.* Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology. *Crit Rev Oncol Hematol* (2010).
172. Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. & Kroemer, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* **8**, 59-73 (2008).
173. Longley, D.B., Harkin, D.P. & Johnston, P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* **3**, 330-338 (2003).
174. Dietlin, T.A., *et al.* Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion. *J Leukoc Biol* **81**, 1205-1212 (2007).
175. Zhu, B., *et al.* CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **179**, 5228-5237 (2007).
176. Dworacki, G., *et al.* Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. *Clin Cancer Res* **7**, 947s-957s (2001).
177. Borregaard, N., Sorensen, O.E. & Theilgaard-Monch, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* **28**, 340-345 (2007).
178. Terabe, M., *et al.* NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* **1**, 515-520 (2000).
179. Terabe, M., Park, J.M. & Berzofsky, J.A. Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* **53**, 79-85 (2004).
180. Baxevanis, C.N., Perez, S.A. & Papamichail, M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 317-324 (2009).
181. Ramakrishnan, R. & Gabrilovich, D.I. Mechanism of synergistic effect of chemotherapy and immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother* (2010).

182. Emens, L.A. Chemoimmunotherapy. *Cancer J* **16**, 295-303 (2010).
183. Lake, R.A. & Robinson, B.W. Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat Rev Cancer* **5**, 397-405 (2005).
184. Ugel, S., E. Peranzoni, M. Piccoli, C.M. Diaz-Montero, E. Falisi, S. Solito, F. Papalini, A. Cabrelle, P. De Coppi, G. Basso, P. Zanovello, A.J. Montero, G. Onicescu, E. Garrett-Mayer, S. Mandruzzato, and V. Bronte. 2010. Chemotherapy disrupts tolerogenic niche in the spleen. (*submitted*)

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare a mamma, papà e Alessandro: grazie per il sostegno incondizionato, l'incoraggiamento, la presenza, la comprensione e la grande pazienza nell'aspettarmi la sera, anche se a ore tarde..

Grazie al mio fratellone che, anche se distante, mi è sempre stato vicino. Grazie a Yok, e alle due nipotine *birbe* che sanno sempre rubarmi un sorriso!

Grazie alle mie colleghe, che mi hanno aiutato nella realizzazione di questo progetto. In particolare ringrazio Samantha, con la quale ho condiviso le soddisfazioni ed anche le quotidiane difficoltà del nostro lavoro. Grazie a Fiorenza, per l'amicizia dimostrata. Grazie ad Ary, per portare sempre una ventata di allegria in laboratorio. E grazie a Laura, che nell'ultimo periodo mi ha dato una gran mano!

Grazie ad Anna M., per la sua inestimabile generosità, per la pazienza dimostrata nel saper sopportare i nostri sfoghi e per averci sempre dato in prestito qualche anticorpo! Grazie anche ad Anna P., per l'amicizia e per la sua disponibilità.

Un grazie anche a Nada, Gigi, Stefano ed Elisa, per la loro gentilezza e la loro simpatia.

Grazie a Rita e a Betta, che mi hanno ben accolta al mio arrivo al Busonera, e che mi hanno sempre ben considerato e sempre aiutato, nonostante il *qui pro quo* (che noi sappiamo)! Grazie anche ad Antonella, che mette sempre allegria.

Grazie a Renzo e Pierantonio, per le loro consulenze informatiche e grafiche.

Grazie alle ragazze dell'Oncoematologia Pediatrica, Samuela e Chiara, per averci aiutato con i citospin ma soprattutto con i *sorting*. Grazie anche al Prof. Basso che ci ha fornito i campioni essenziali per il nostro progetto di ricerca.

Grazie ad Andrea Doni che, da quel di Milano, mi ha dato delle preziose dritte sulla microscopia confocale.

E un sentito ringraziamento anche a Susanna e alla Prof.ssa Zanovello, per avermi dato la possibilità di raggiungere questo importante obiettivo.