



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche

Scuola di Dottorato di Ricerca in Oncologia e Oncologia Chirurgica
Ciclo XXII

**Cellule soppressorie di derivazione mieloide: espansione
nei pazienti con tumore, induzione *in vitro* con fattori di
crescita ed analisi dei meccanismi molecolari coinvolti
nell'immunosoppressione**

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

Supervisore : Dott. ssa Susanna Mandruzzato

Dottoranda : Dott.ssa Samantha Solito

Ai miei genitori,
a mia sorella Simona,
a Cristian

INDICE

ABBREVIAZIONI	1
ABSTRACT	3
RIASSUNTO	5
1. INTRODUZIONE	9
1. Gli antigeni tumorali e l'immunità anti-tumorale	9
2. Infiammazione e tumore	10
3. Dall'immunosorveglianza all' <i>escape</i> del sistema immunitario: la teoria dell' <i>immunoediting</i>	13
4. La tolleranza del sistema immunitario	16
4.1 Cellule T regolatorie (Treg)	16
4.2 Macrofagi associati a tumore (TAM)	17
4.3 Cellule dendritiche immature	18
4.4 Cellule T Natural killer (NKT)	19
5. Cellule mieloidi soppressorie di derivazione mieloide (MDSC)	19
5.1 MDSC nei modelli murini	21
5.2 MDSC isolate da pazienti	22
5.3 MDSC: evidenze in patologie non tumorali	24
5.4 I fattori coinvolti nell'espansione delle MDSC	25
5.5 L'attivazione delle MDSC	26
5.6 Meccanismi di soppressione utilizzati dalle MDSC	27
5.7 Specificità antigenica della soppressione mediata dalle MDSC	29
5.8 MDSC come target terapeutico	30
5.9 Il ruolo del G-CSF e GM-CSF nella regolazione della risposta immunitaria	31
2. SCOPO DEL LAVORO	33
3. MATERIALI E METODI	35
1. Coorte di pazienti affetti da tumore	35

2. Isolamento PBMC e PMN da sangue periferico di pazienti con tumore e donatori sani	35
3. Separazione immunomagnetica della frazione CD14 ⁺ dai PBMC	36
4. Analisi citofluorimetrica dei PBMC e dei PMN isolati da pazienti	36
5. Saggio di proliferazione con timidina triziata	37
6. Saggio di proliferazione con CFSE	37
7. Campioni biologici e trattamento <i>in vitro</i> con citochine	38
8. Analisi citofluorimetrica delle cellule di midollo	39
9. Saggi di proliferazione	39
10. Marcatura delle colture di BM con CFSE	40
11. Saggio di proliferazione in presenza di inserto (<i>Transwell</i>)	40
12. Analisi dell'espressione della catena ζ del CD3	40
13. Separazione immunomagnetica della componente <i>Lineage</i> negativa da BM-MDSC	41
14. Produzione dei vettori virali ed infezione delle BM-MDSC	41
15. Real Time PCR	42
16. Western blotting	42
17. Saggi di proliferazione con BM-MDSC con C/EBP β silenziato	43
18. Analisi statistica	43
4. RISULTATI	45
1. Espansione di una popolazione di cellule soppressorie di derivazione mieloide in pazienti con carcinoma del colon e melanoma	45
1.1 Soppressione dell'attivazione linfocitaria da parte di sottopopolazioni leucocitarie	45
1.2 Overespressione di IL4R α nei PBMC e nei PMN isolati da sangue periferico dei pazienti	48
1.3 Correlazione dell'attività immunosoppressoria con l'espressione di IL4R α	50

1.4	Caratterizzazione della proliferazione linfocitaria in presenza di cellule mieloidi soppressorie isolate da pazienti con tumore	50
2.	Induzione <i>in vitro</i> di cellule mieloidi con capacità soppressoria mediante trattamento del sangue midollare con citochine	53
2.1	Analisi di sottopopolazioni mieloidi da sangue midollare	53
2.2	Il trattamento del BM con G-CSF, GM-CSF e IL-6 induce popolazioni mieloidi immature dotate di attività soppressoria	57
2.2.1	Analisi fenotipica del BM dopo trattamento con diverse combinazioni di citochine	57
2.2.2	Attività soppressoria delle BM-MDSC nei confronti di linfociti attivati da alloantigeni e da mitogeni	62
3.	Definizione dei meccanismi molecolari coinvolti nell'immunosoppressione indotta dalle BM-MDSC	69
3.1	La soppressione mediata dalla BM-MDSC richiede il contatto cellula-cellula	69
3.2	BM-MDSC diminuiscono l'espressione della catena ζ del CD3 dei linfociti	70
3.3	C-EBP β è indispensabile per il programma di immunosoppressione	71
3.4	IL-4 e IL-13 sono richiesti per la soppressione	73
4.	Definizione delle sottopopolazioni delle BM-MDSC responsabili della immunosoppressione	75
4.1	Separazione delle BM-MDSC in sottopopolazioni <i>lineage</i> positiva e negativa e analisi della soppressione indotta	75
	5. DISCUSSIONE	79
	RINGRAZIAMENTI	85
	6. BIBLIOGRAFIA	87

ABBREVIAZIONI

APC: *antigen presenting cell*
ATRA: *all trans-retinoic acid*
BM-MDSC: *bone marrow-derived myeloid-derived suppressor cells*
C/EBP β : *CCAAT/enhancer binding protein β*
CD: *cluster of differentiation*
CDK4: *cyclin-dependent kinase 4*
CFSE: *carboxyl fluorescein succinimidyl ester*
COX-2: *cyclooxygenase-2*
CTL: *cytotoxic T lymphocytes*
EDTA: *ethyl diamine tetrachloroacetic acid*
FBS: *fetal bovine serum*
Fc: *fragment crystallizable*
FoxP3: *forkhead box P3*
GAPDH: *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*
GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
HCF: *hanks per citometria a flusso*
HIF-1 α : *hypoxia-inducible factor 1 α*
HLA: *human leukocyte antigen*
DC: *dendritic cell*
IFN- γ : *interferon- γ*
IL: *interleukin*
IL4R α : *alpha subunit of the interleukin 4 receptor*
IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
iNOS: *nitric oxide synthase inducible*
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*

NF- κ B: *nuclear factor-kappa B*
NK: *natural killer*
NKT: *natural killer T*
NO: *nitric oxide*
NSCLC: *non-small cell lung carcinoma*
NT: *non trattato*
PBL: *peripheral blood leukocytes*
PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*
PBS: *phosphate buffered saline*
PDGF: *platelet-derived growth factor*
PGE₂: *prostaglandin E 2*
PMN: *polymorphonuclear cells*
RBC: *contaminating red blood cells*
ROS: *reactive oxygen species*
SCF: *stem cell factor*
SE: *standard error*
shRNA: *short hairpin RNA*
STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*
TAA: *tumor associated antigen*
TAM: *tumor associated macrophages*
TCR: *T cell receptor*
TDSF: *tumor-derived suppressor factors*
TGF- β : *tumor growth factor β*
Th: *T helper*
TMO: *Bone Marrow Transplantation*
TNF α : *tumor necrosis factor α*
Treg: *T regulatory cells*
TSTA: *tumor-specific transplantation antigen*
VEGF: *vascular endothelial growth factor*
JAK3: *Janus kinase*

ABSTRACT

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are a heterogeneous population of cells that expands during cancer, inflammation and infection and are potent inhibitors of T-cell-mediated antitumor immunity. MDSC accumulate in the blood, lymph nodes and bone marrow and at tumor sites in most patients and experimental animals with cancer and inhibit both adaptive and innate immunity. Expansion, mobilization and activation of MDSC is driven by tumors-secreted growth factors, and by a profound alteration of myelopoiesis.

In cancer patients the nature of MDSC is still poorly defined since evidence exists for both monocytic and granulocytic features. In the present study we evaluated the phenotype and the suppressive activity of leukocyte subsets freshly isolated from the blood of melanoma and colon cancer patients. Our results indicate that cells with characteristics of MDSC can be found in both mononuclear and polymorphonuclear fraction, and that a useful marker for their identification is the alpha chain of IL4R (IL4R α).

Subsequently, we defined growth factors able to generate MDSC *in vitro* from human bone marrow precursors and to use these cells to characterize better the biology and phenotype of human MDSC. We demonstrated that combinations of some cytokine, such as G-CSF, GM-CSF and IL-6 induce the expansion of bone-marrow immature myeloid populations (BM-MDSC) expressing IL4R α , with phenotype and inhibitory activity comparable to patients' MDSC. Functional assays revealed that only cytokine-treated bone marrow cells are able to suppress lymphocyte proliferation, while *ex-vivo* isolated cells and untreated bone marrow cells do not interfere significantly with T lymphocyte proliferation. BM-MDSC suppress activation of both alloactivated and mitogen activated T lymphocytes.

We further examined BM-MDSC mechanisms of suppression, and we demonstrated that these cells are able to suppress lymphocyte proliferation by decreasing lymphocyte CD3 ζ chain expression and that suppression requires cell-to-

cell contact. Immunoregulatory activity of BM-MDSC is dependent on C/EBP β transcription factor, a key component of the emergency myelopoiesis, because the knock down of C/EBP β leads to a marked decrease in the immunosuppressive activity of BM-MDSC.

Since BM-derived MDSC consist of a heterogeneous myeloid population, we separated myeloid fractions with immunomagnetic sorting and we demonstrated that the *Lineage* negative fraction of BM-MDSC contains the main immunosuppressive activity by inducing a decrease of lymphocyte proliferation and of CD3 ϵ expression.

RIASSUNTO

Le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) costituiscono una popolazione molto eterogenea che viene espansa in alcune condizioni patologiche, come le neoplasie, le infiammazioni e le infezioni ed ha la capacità di inibire potentemente l'immunità antitumorale mediata dai linfociti T. Le MDSC si accumulano nel sangue, nei linfonodi, nel midollo osseo e nel microambiente tumorale, in pazienti ed in modelli animali portatori di tumore e inibiscono sia la risposta immunitaria innata, che quella adattativa. L'espansione, la mobilizzazione e l'attivazione delle MDSC è indotta da fattori di crescita rilasciati dalla cellule tumorali e da un'estesa alterazione della mielopoiesi.

In pazienti portatori di tumore la caratterizzazione fenotipica e funzionale delle MDSC non è ancora completamente definita, ma esistono evidenze sia sulla natura granulocitaria che su quella monocitaria di tale popolazione. In questo lavoro di tesi abbiamo valutato il fenotipo e l'attività soppressoria di popolazioni leucocitarie isolate dal sangue periferico di pazienti affetti da tumore del colon e melanoma. I nostri risultati indicano che cellule con caratteristiche delle MDSC possono essere trovate sia nella frazione monocitaria che in quella granulocitaria e che un marcatore utile per la loro identificazione è la catena α del recettore dell'interleuchina 4 (IL4R α).

Nella seconda parte di questo lavoro abbiamo definito i fattori di crescita necessari per l'induzione *in vitro* di MDSC da progenitori mieloidi midollari, ed abbiamo usato tali cellule per caratterizzare la biologia ed il fenotipo delle MDSC. Abbiamo dimostrato che le combinazioni di alcune citochine, come G-CSF, GM-CSF e IL-6 inducono l'espansione di popolazioni mieloidi immature midollari (BM-MDSC) che esprimono IL4R α e dotate di caratteristiche fenotipiche e funzionali simili a quelle delle MDSC espanse nei pazienti. I saggi funzionali hanno mostrato che solo le cellule trattate con le citochine sono in grado di inibire la proliferazione linfocitaria, mentre le cellule isolate *ex-vivo* o le colture mantenute *in vitro* senza

l'aggiunta dei fattori di crescita, non interferiscono in modo significativo con la proliferazione linfocitaria.

Le MDSC derivate da midollo (BM-MDSC) sopprimono sia la proliferazione dei linfociti attivati da alloantigeni, che la proliferazione di linfociti attivati da mitogeni.

Abbiamo quindi analizzato i meccanismi di soppressione delle BM-MDSC ed abbiamo dimostrato che tali cellule sono in grado di sopprimere la proliferazione linfocitaria inducendo una diminuzione dell'espressione della catena ζ del CD3 e che la soppressione mediata dalle BM-MDSC richiede il contatto cellula-cellula. L'attività immunoregolatrice delle BM-MDSC dipende dal fattore di trascrizione C/EBP β , un componente chiave della granulopoiesi di emergenza, dal momento che la diminuzione della proteina induce una marcata inibizione dell'attività soppressoria delle BM-MDSC.

Infine abbiamo separato alcune sottopopolazioni mieloidi presenti nelle BM-MDSC, poichè queste sono rappresentate da una popolazione mieloide eterogenea, ed abbiamo dimostrato che la frazione cellulare *Lineage*⁻ è responsabile della maggiore attività immunosoppressoria inducendo una diminuzione della proliferazione linfocitaria e dell'espressione del CD3 ϵ di superficie.

It is an evolutionary necessity that there should be some mechanism for eliminating or inactivating such potentially dangerous mutant cells and it is postulated that this mechanism is of immunological character.

Burnet

1. INTRODUZIONE

1. Gli antigeni tumorali e l'immunità anti-tumorale

Gli studi condotti nel campo dell'immunologia dei tumori negli ultimi quarant'anni hanno dimostrato che il sistema immunitario ha la capacità di riconoscere le cellule tumorali e di eliminarle.

La pietra miliare fu certamente rappresentata dalla caratterizzazione molecolare degli antigeni tumorali, prima nel topo e poi nell'uomo (1, 2). La classificazione degli antigeni tumorali deriva dagli studi condotti principalmente sul melanoma e comprende antigeni che possono essere classificati in quattro gruppi (3)

1. Antigeni unici o tumore-specifici: derivano da mutazioni somatiche puntiformi a livello nucleotidico, con la conseguente sostituzione di un amminoacido nella sequenza della proteina tumorale. Tali antigeni, che possono raramente essere anche il risultato di alterazioni del processo di splicing dell'RNA, sono unici, perché sono espressi esclusivamente dalle cellule tumorali e non dalla controparte normale (4).

2. Antigeni germinali: questo gruppo comprende antigeni codificati da geni che sono silenti nella maggior parte dei tessuti sani, ma che sono attivati in differenti tumori di diversa origine istologica. I capostipiti di questo gruppo sono rappresentati dagli antigeni codificati dai geni MAGE. Sono stati identificati diversi antigeni codificati dai geni MAGE che sono in grado di legare diverse molecole HLA (*human leukocyte antigen*) di classe I e II e sono riconosciuti da linfociti che riconoscono il tumore autologo. Il primo antigene umano identificato è un nonapeptide codificato dal gene MAGE-1 e presentato dalla molecola HLA-A1 (2). La lista di tali proteine, appartenenti alle famiglie MAGE, GAGE e BAGE, si è espansa velocemente negli ultimi anni (5). Le uniche cellule dei tessuti sani in cui si osserva una significativa espressione di questi geni sono i trofoblasti della placenta e le cellule germinali dei testicoli; poiché queste cellule non esprimono molecole HLA di classe I in grado di presentare l'antigene, la sola attivazione del gene non dà luogo ad espressione dell'antigene, e pertanto possono essere definiti correttamente antigeni tumore-specifici.

3. Antigeni di differenziazione dei melanociti: sono proteine espresse sia dai melanociti normali che dalle cellule di melanoma e la loro caratteristica è quella di identificare lo stadio di differenziazione di diverse sottopopolazioni cellulari (6). Molti antigeni appartenenti a questo gruppo sono proteine della membrana dei melanosomi, organelli coinvolti nel processo di sintesi della melanina.

4. Antigeni che derivano da proteine la cui espressione è aumentata: è stato osservato che alcuni cloni CTL (*cytotoxic T lymphocytes*), ottenuti stimolando i PBL (*peripheral blood leukocytes*) con il tumore autologo, pur mostrando una lisi specifica delle cellule tumorali, riconoscono antigeni codificati da geni non mutati espressi sia dal tumore, che dai tessuti normali sebbene il clone CTL sia in grado di lisare in modo specifico le cellule tumorali. Questo fenomeno è stato spiegato con l'osservazione che entrambi i tipi cellulari esprimono questi antigeni, ma in modo quantitativamente differente: infatti, le cellule normali li esprimono a bassi livelli, mentre le cellule tumorali sono caratterizzate da un'iperespressione per cui solo queste vengono riconosciute e lisate dai CTL specifici.

L'identificazione degli antigeni associati a tumore (TAA, *tumor associated antigens*) come identità molecolare e la dissezione dei meccanismi molecolari coinvolti nell'immunità anti-tumorale si è rivelata nel corso degli anni cruciale per lo sviluppo di nuove strategie di vaccinazione e immunoterapie. Tuttavia numerosi studi hanno dimostrato che la presenza di un repertorio di anticorpi o linfociti T contro i TAA, non si traduce sempre in una risposta efficace anti-tumorale, ma che tale processo necessita dell'adeguata attivazione ed espansione del pool linfocitario e dell'induzione della risposta infiammatoria (7).

2. Infiammazione e tumore

I mediatori solubili e gli effettori cellulari coinvolti nel processo infiammatorio svolgono un ruolo importante nel microambiente tumorale. La stretta relazione tra l'infiammazione e il tumore fu considerata nel diciannovesimo secolo, sulla base dell'osservazione che i tumori spesso possono originare dai siti di infiammazione cronica e che cellule infiammatorie possono essere presenti in biopsie estratte da tessuti tumorali (8). La correlazione tra infiammazione e tumore può essere considerata come il risultato dell'attivazione di due vie (9).

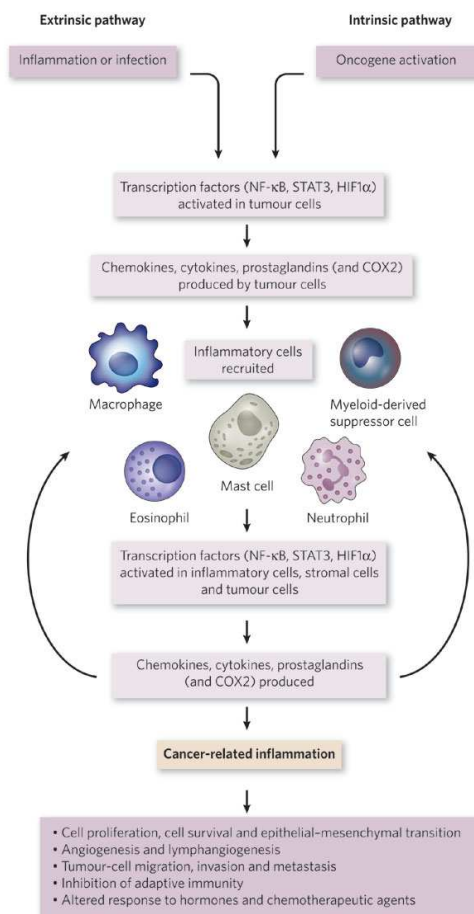


Figura 1. Vie di segnalazione tra tumore ed infiammazione. La via intrinseca è attivata da eventi genetici che inducono il tumore, mentre nella via estrinseca condizioni infiammatorie o infettive predispongono allo sviluppo della neoplasia. Le due vie convergono mediante l'attivazione dei fattori di trascrizione NF- κ B, STAT-3 e HIF-1 α , che regolano la produzione di citochine infiammatorie ed il reclutamento di cellule mielomonocitarie (tratto da Cancer-related inflammation, Mantovani, Nature reviews Immunology, 2008).

La via intrinseca dipende da alterazioni genetiche a causa delle quali le cellule tumorali trasformate contribuiscono a generare un ambiente infiammatorio. La via estrinseca è attivata da stati infiammatori cronici o malattie infettive che predispongono allo sviluppo del tumore. Queste due vie convergono e mediano l'attivazione di NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) e HIF-1 α (*hypoxia inducible factor 1 α*), fattori di trascrizione che coordinano la produzione di citochine e chemochine, che a loro volta richiamano ed attivano sottopopolazioni leucocitarie di tipo mielo-monocitario. Alcuni geni oncosoppressori possono regolare la produzione di mediatori dell'infiammazione; un esempio è rappresentato dal TGF- β (*transforming growth factor β*), una proteina che sembra avere un ruolo fondamentale nella generazione del microambiente infiammatorio pro-tumorale, mediante l'attivazione ed il rilascio di

CXCL5 e CXCL12, due chemochine che sono in grado di reclutare cellule mieloidi, potenti soppressori della risposta immunitaria adattativa (10).

NF- κ B è un fattore di trascrizione che attiva l'espressione di geni che codificano per citochine infiammatorie, molecole di adesione, enzimi coinvolti nella sintesi delle prostaglandine (come la COX-2, *cicloxygenase 2*), iNOS (*nitric oxide synthase*), fattori angiogenetici e proteine anti-apoptotiche; tale proteina ha ruolo nelle prime fasi dell'insorgenza di un tumore, ma soprattutto nella progressione tumorale (11).

STAT3 è costitutivamente attivato nelle cellule tumorali e nelle cellule del sistema immunitario ed è coinvolto nei processi di oncogenesi e di inibizione dell'apoptosi (12). L'attivazione di STAT3 nelle cellule tumorali aumenta la capacità del tumore di eludere la sorveglianza immunitaria (13).

In quasi tutti i tumori è presente un infiltrato di cellule leucocitarie e ci sono evidenze che tutte queste componenti cellulari (TAM, *tumor associated macrophages*; MDSC, *myeloid derived suppressor cells*; iDC, *immature dendritic cells* e, una sottopopolazione di monociti che esprimono TIE-2) rilasciate dal midollo osseo possono essere coinvolte nella carcinogenesi e nel processo di metastatizzazione. Inoltre il VEGF, *vascular endothelial growth factor*, è in grado di favorire il reclutamento di popolazioni monocitarie nel microambiente tumorale e i monociti a loro volta secernono molecole pro-angiogenetiche, contribuendo in questo modo al processo angiogenetico (14).

Numerosi studi sono stati condotti allo scopo di comprendere il ruolo dei mediatori del processo infiammatorio negli stadi precoci dello sviluppo tumorale; tuttavia è oggi noto che le molecole infiammatorie svolgono una funzione fondamentale nei processi di migrazione, invasione e metastasi attuati dalle cellule tumorali. Infatti, molte cellule di origine epiteliale e mesenchimale, dopo essere andate incontro al processo di trasformazione, cominciando ad esprimere recettori per le chemochine (per esempio CXCR4), risultano favorite nei processi di migrazione e sopravvivenza (15). Inoltre la capacità di invadere il tessuto circostante a quello del tumore primario in molti casi può aumentare in presenza di citochine infiammatorie, come TNF α (*tumor necrosis factor α*), IL-1 β e IL-6, che a loro volta sono in grado di indurre un aumento dell'espressione dei recettori per le chemochine in cellule che normalmente ne risultano prive (16).

3. Dall'immunosorveglianza all'*escape* del sistema immunitario: la teoria dell'*immunoediting*

Agli inizi degli anni '50, esperimenti di trapianto di tumori realizzati in topi singenici dimostrarono che neoplasie indotte da cancerogeni chimici potevano provocare una reazione di rigetto diretta contro lo stesso tumore. Quando il trapianto è effettuato in un animale singenico, il tumore crescendo induce la morte dell'ospite, mentre, se reimpiantato nell'ospite originario, il tumore è rigettato. Il rigetto è specifico verso il tumore d'origine, dato che altri tumori indotti con lo stesso cancerogeno si sviluppano normalmente e non sono rigettati. La protezione contro il tumore iniziale ha suggerito per la prima volta che le cellule tumorali potessero esprimere degli antigeni di rigetto; per le analogie esistenti tra il rigetto di un tumore ed il rigetto di un allotrapianto, gli antigeni responsabili di questo tipo di reazione furono all'epoca denominati TSTA, (*tumor specific trasplantation antigen*) (17). La presenza degli TSTA fu inoltre dimostrata in tumori murini indotti da virus oncogeni (18). In questo caso però l'impianto di un tumore indotto da un virus conferiva una protezione nei confronti di altri tumori causati dallo stesso virus.

Sulla base di questi risultati, Burnet e Thomas proposero una teoria secondo la quale cellule tumorali compaiono frequentemente in un organismo, ma vengono rigettate dal sistema immunitario grazie al riconoscimento su queste cellule di antigeni caratteristici della trasformazione neoplastica. La comparsa di una neoplasia sarebbe dunque dovuta ad una "*defaillance*" del sistema immunitario (19).

Questa ipotesi, denominata teoria dell'immunosorveglianza, fu più tardi messa in discussione dal lavoro di Hewitt che, contrariamente a quanto osservato con i tumori indotti dai cancerogeni chimici, dimostrò che i tumori spontanei non erano capaci di provocare delle reazioni di rigetto nell'ospite singenico (20). Questi esperimenti suggerivano che i tumori spontanei fossero poco o per niente immunogenici e che gli antigeni dei tumori indotti sperimentalmente erano degli artefatti di laboratorio.

Questa teoria, nonostante fosse stata contestata da diversi altri studi, continuò ad esercitare un certo fascino per i ricercatori e ad essere riproposta negli anni

successivi, ma il problema principale era costituito dal fatto che era praticamente impossibile da dimostrare negli animali immunocompetenti. Tuttavia lo sviluppo di sofisticati modelli animali sviluppati negli anni successivi e dotati di immunodeficienze definite a livello molecolare diedero nuovo impulso a questa teoria.

Fu, infatti, chiarito il ruolo fondamentale dell'IFN- γ (*interferon- γ*) nella protezione nei confronti del tumore e venne inoltre compresa l'importanza della perforina, una proteina espressa nei granuli citolitici dei linfociti T citotossici e delle cellule NK, implicata nei processi di eliminazione delle cellule tumorali.

Tuttavia gli studi condotti nel corso degli anni avevano dimostrato che l'interazione tra sistema immunitario e tumore è molto più complessa di quanto inizialmente ipotizzato dalla teoria dell'immunosorveglianza. I lavori successivi ribadirono la validità del concetto di immunosorveglianza e dimostrarono che la protezione dall'insorgenza del tumore dipende non solo dalla risposta immunitaria adattativa, ma anche da quella innata; inoltre fu compreso che il sistema immunitario può favorire l'insorgenza di tumori primitivi con ridotta immunogenicità che sono in grado di sfuggire al controllo e all'eliminazione da parte del sistema immunitario stesso. Queste nuove acquisizioni resero il termine immunosorveglianza non più adatto a descrivere questo processo così complesso e nel 2002 Robert Schreiber propose la teoria dell'*immunoediting*, un processo dinamico costituito da tre fasi: eliminazione, equilibrio ed *escape* (21).

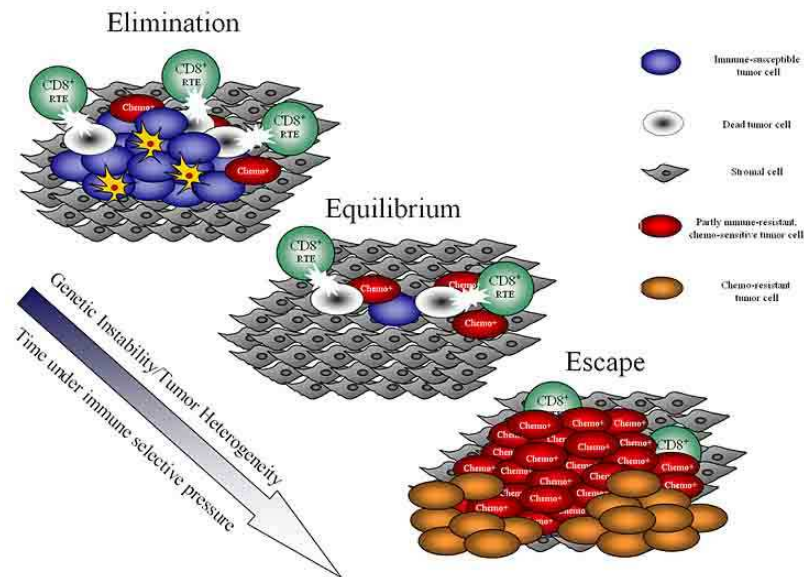


Figura 2. Rappresentazione schematica della teoria dell'immunoeediting. La fase di eliminazione corrisponde all'immunosorveglianza; la fase di equilibrio rappresenta il processo attraverso il quale il sistema immunitario seleziona la generazione di varianti tumorali con capacità crescenti di sopravvivere all'attacco del sistema immunitario. Infine la fase di *escape* definisce la crescita incontrollata del tumore (tratto da Dendritic cell vaccines and immunity in glioma patients, Wheeler, Frontiers in Biosciences, 2005).

La fase dell'eliminazione rappresenta esattamente lo stesso processo descritto nella teoria iniziale dell'immunosorveglianza, cioè è la fase in cui il sistema immunitario è in grado di riconoscere ed eliminare le cellule tumorali. Se in questa fase si assiste alla completa eliminazione delle cellule tumorali, il processo dell'*immunoeediting* termina senza passare alle fasi successive. In alcuni casi, però, può verificarsi la parziale eliminazione del tumore con la conseguente generazione della fase successiva di equilibrio. In questa fase le cellule tumorali possono rimanere dormienti o continuare ad evolvere, accumulando mutazioni del DNA o cambiamenti nell'espressione genica degli antigeni tumorali. In questa fase dinamica, il sistema immunitario esercita una pressione selettiva sui cloni potenzialmente suscettibili; contemporaneamente, però, possono avere origine nuove varianti che sono resistenti all'attacco immunitario. Nel processo di *escape* le varianti tumorali, che la risposta immunitaria non è stata in grado di debellare, iniziano ad espandersi in modo incontrollato attraverso cambiamenti genetici ed epigenetici ed inducendo la progressione della crescita tumorale.

La mancata risposta immunitaria che porta alla crescita tumorale può avvenire attraverso l'induzione della tolleranza periferica o centrale, oppure attraverso l'attivazione di fattori all'interno del microambiente tumorale. Numerosi studi hanno documentato che l'*escape* dal controllo del sistema immunitario può essere una

conseguenza diretta delle alterazioni che avvengono a livello delle cellule tumorali; ad esempio, alcune cellule tumorali sviluppano delle alterazioni nelle vie di trasduzione del segnale o della processazione e presentazione dell'antigene, che facilitano l'elusione della risposta adattativa. Alcuni esempi di questo tipo sono rappresentati dalla perdita dell'espressione delle molecole HLA di classe I, dall'assenza di componenti proteiche del recettore dell'IFN- γ , dall'attivazione dei linfociti in assenza dell'adeguato costimolo, dall'espressione sulle cellule tumorali di molecole inibitorie per i linfociti (come B7-H1, HLA-G e HLA-E), dalla perdita degli antigeni tumorali, dal rilascio di fattori immunosoppressori (come TGF- β , IL-10, VEGF e gangliosidi), dall'espressione di indoleamine 2,3 dioxigenase, dalla resistenza del tumore ai segnali citotossici, dall'overespressione di molecole anti-apoptotiche e dall'espansione di popolazioni immunosoppressive (come linfociti T regolatori, cellule dendritiche immature e cellule soppressive di derivazione mieloide) (22).

4. La tolleranza del sistema immunitario

La tolleranza immunitaria è fondamentale per la soppressione della reattività contro gli antigeni *self* e per la prevenzione delle malattie autoimmuni; tuttavia le cellule tumorali a causa della loro origine *self*, possono sfruttare i meccanismi fisiologici di tolleranza per sfuggire all'attacco del sistema immunitario, attraverso una complessa rete di interazioni che comprende l'espansione di cellule tolerogeniche, che favoriscono la crescita tumorale.

4.1 Cellule T regolatorie (Treg)

Descritte per la prima volta da Sakaguchi come una popolazione di linfociti CD4⁺, che co-esprimono CD25, le cellule Treg hanno un ruolo fondamentale nel controllo della reattività contro gli antigeni *self*, inibiscono le risposte infiammatorie croniche e mantengono la tolleranza immunitaria (23). Non sono stati identificati marcatori specifici per i linfociti Treg, ma il fattore di trascrizione FoxP3 (*forkhead box P3*) sembra essere essenziale per lo sviluppo e la funzione di queste cellule. Le Treg naturali originano nel timo e sono presenti negli individui sani fin dalla nascita (24). Cellule CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ possono avere origine dalle cellule T CD4⁺ CD25⁺

naive in varie condizioni. Inoltre negli ultimi dieci anni sono stati descritti molti tipi di cellule con attività regolatoria generate *in vivo* o *in vitro* da cellule CD4⁺ mature, sotto specifiche condizioni di stimolazione antigenica o esposizione a citochine.

Questa popolazione tolerogena nella fase iniziale di immunosoppressione necessita dell'esposizione dell'antigene, mentre nella fase effettrice dell'inibizione della risposta immunitaria diventa antigene-indipendente. Il rilascio di citochine nel microambiente tumorale ed il contatto cellula-cellula sembrano essere meccanismi importanti che contribuiscono all'immunosoppressione mediata dalle Treg.

4.2 Macrofagi associati a tumore (TAM)

I macrofagi rappresentano circa il 50% della massa tumorale e rivestono un ruolo fondamentale nel microambiente neoplastico. Dopo aver preso origine dai monociti del sangue periferico, i macrofagi possono differenziarsi in M1 (o attivati classicamente) o M2 (o attivati alternativamente). I macrofagi associati a tumore (TAM) hanno un fenotipo di tipo M2, sono reclutati al sito tumorale da molecole prodotte da cellule neoplastiche e stromali e il loro ruolo è quello di stimolare sopravvivenza, proliferazione e disseminazione tumorale (25). Le molecole chemioattraenti per i TAM sono chemochine come CCL2, citochine come VEGF, PDGF (*platelet-derived growth factor*) e M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) e proteine derivate dal processo di degradazione della matrice extracellulare, come fibrinogeno e fibronectina. Inoltre la produzione di IL-4 e IL-13 da parte dei linfociti infiltranti Th2 (*T helper*) e la secrezione di TGF- β e IL-10 da fibroblasti, cellule neoplastiche e Treg favoriscono la polarizzazione M2 tipica dei TAM. I TAM sono in grado di produrre molecole che influenzano direttamente la crescita neoplastica, aumentano il processo angiogenetico, regolano cambiamenti strutturali della matrice extracellulare (9); un esempio è rappresentato dal rilascio di IL-1 e TNF, citochine che promuovono l'attivazione costitutiva di NF- κ B nelle cellule tumorali, con la conseguente acquisizione delle tipiche caratteristiche del fenotipo tumorale aggressivo, come l'insensibilità all'inibizione da crescita, la resistenza ai segnali apoptotici, l'angiogenesi, la migrazione, l'invasione dei tessuti. Inoltre i TAM rilasciano IL-10 e chemochine, che contribuiscono al potenziamento della funzione soppressoria nei confronti delle cellule T. Infine i TAM rivestono una

funzione fondamentale nel rimodellamento strutturale della matrice extracellulare, favorendo in tal senso il processo di evasione e metastasi tumorale.

4.3 Cellule dendritiche immature

Le cellule dendritiche rivestono un ruolo molto importante nel processo di iniziazione della risposta immunitaria anti-tumorale e contro patogeni esterni (26). Le cellule dendritiche immature (iDC) derivano dal midollo osseo, risiedono nei tessuti periferici e sono richiamate nel sito infiammatorio da segnali rilasciati dagli agenti patogeni. Dopo aver catturato gli antigeni *non self*, le iDC vanno incontro al processo di maturazione e migrano verso gli organi linfoidi secondari; nei linfonodi avviene la presentazione dell'antigene da parte delle DC ormai mature ai linfociti T *naive*, che dando origine agli effettori T e alle cellule della memoria, attivano le risposte immunitarie primarie e secondarie (27). Allo stesso modo le iDC sono in grado di processare e presentare antigeni *self* che derivano da cellule apoptotiche che vanno incontro al *turnover* fisiologico; in assenza dell'amplificazione indotta dalle molecole co-stimolatorie, però, le DC producono anergia delle cellule T e contribuiscono alla generazione delle Treg per la tolleranza immunitaria.

Numerosi studi hanno chiaramente dimostrato che in diversi tumori si verifica l'espansione di iDC, che agiscono mediante l'attivazione di meccanismi di soppressione. Le iDC indotte, comprese le DC mieloidi (mDC) e le plasmacitoidi (pDC), derivano dal midollo osseo, sono reclutate al sito tumorale e funzionalmente modulate attraverso i fattori solubili rilasciati dal tumore (TDSFs, *tumor-derived suppressor factors*, ad esempio VEGF). Le DC associate al tumore (TiDC) possono catturare gli antigeni tumorali derivati dalle cellule apoptotiche, ma dopo essere migrate ai linfonodi, non essendo in grado di presentare i TAA, a causa dell'assenza dei segnali co-stimolatori, inducono tolleranza. Le TiDC sopprimono la proliferazione dei linfociti CD4⁺ e dei CD8⁺ e sono in grado di indurre le Treg, che a loro volta diminuiscono l'espressione di CD80/CD86 sulla superficie delle DC derivate dal midollo osseo (28). Un altro importante meccanismo con il quale le iDC contribuiscono alla tolleranza immunitaria è rappresentato dal rilascio di citochine, come IL-10 e TGF- β , dopo il processamento di cellule tumorali apoptotiche. Inoltre le iDC possono inibire la risposta immunitaria, mediante la produzione di ROS (*reactive oxygen species*).

4.4 Cellule T Natural killer (NKT)

Negli ultimi dieci anni è stata identificata una nuova popolazione non convenzionale di cellule T, che svolgono la loro funzione all'interfaccia tra la risposta immunitaria innata e quella adattativa. Le cellule NKT sono dei linfociti che esprimono i recettori delle cellule T per il riconoscimento antigenico riarrangiati, ma possiedono anche delle caratteristiche comuni con le cellule NK (29).

Mentre la maggior parte dei linfociti T riconoscono peptidi antigenici presentati da molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), le NKT riconoscono glicolipidi presentati da molecole CD1d, proteine che sono funzionalmente simili alle molecole MHC. In assenza di infiammazione, le NKT inducono l'alterazione del segnale del Ca^{2+} , con conseguente secrezione del GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*); al contrario, in presenza di stimoli antimicrobici, alcune citochine infiammatorie, come IL-12 e IL-18, aumentano l'autoreattività delle NK. Dopo l'attivazione, le NKT modulano l'attività delle cellule che esprimono CD1d mediante il segnale di costimolazione del CD40 ed inducono l'attivazione dipendente dall' IFN- γ di altri tipi cellulari, portando in questo modo ad un'amplificazione delle risposte dei linfociti B e T (30). In alcuni modelli murini le NKT sembrano produrre IL-13, citochina che non solo può indurre tolleranza, ma è anche in grado di indurre la produzione di TGF- β da parte delle MDSC, con conseguente inibizione dell'attività di linfociti CD8⁺ citotossici. D'altra parte uno studio molto recente ha invece dimostrato che le NKT potrebbero inibire la funzione soppressoria mediata dalle MDSC durante la progressione tumorale e durante l'infezione microbica (31).

5. Cellule mieloidi soppressorie di derivazione mieloide (MDSC)

Le cellule mieloidi soppressorie furono descritte per la prima volta più di vent'anni fa in pazienti con tumore e furono chiamate "cellule soppressorie naturali" (32). Tuttavia la loro identificazione come cellule di origine mieloide e con funzione di soppressione della risposta immunitaria sia in pazienti che in animali portatori di neoplasia fu chiarita più tardi.

Uno degli aspetti chiave di questa popolazione cellulare è la loro eterogeneità; infatti diversi studi hanno indicato che questa popolazione comprende progenitori

mieloidi e cellule mieloidi immature (macrofagi immaturi, granulociti immaturi e cellule dendritiche immature).

Gli studi condotti negli ultimi anni hanno dimostrato che le cellule mieloidi soppressorie inficiano la risposta immunitaria non solo durante la progressione tumorale, ma anche durante altri tipi di malattie. Data la complessità e l'eterogeneità della natura di tale popolazione tolerogena, qualche anno fa fu proposto di definire tali cellule come MDSC, ovvero cellule soppressorie di derivazione mieloide (33). Le MDSC differiscono dalle altre popolazioni mieloidi con capacità immunoregolatrici: i TAM, ad esempio, non sono considerati delle sottopopolazioni di MDSC, anche se alcuni studi suggeriscono che le MDSC circolanti possono differenziare a TAM Gr-1⁻F4/80⁺ quando raggiungono il tumore (34).

Negli individui sani le cellule mieloidi immature, dopo aver preso origine dal midollo osseo, velocemente differenziano in cellule mature. Al contrario in alcune condizioni patologiche, come i tumori, le infezioni, la sepsi, i traumi, il trapianto di midollo, ed alcune malattie autoimmuni, si ipotizza che un blocco parziale del processo maturativo delle cellule mieloidi immature induca la perdita dell'espressione degli antigeni di superficie tipicamente espressi dalle cellule mature e l'acquisizione di proteine con attività immunosoppressoria. Tale popolazione viene definita come MDSC (35). L'1-5% delle MDSC può formare colonie di cellule mieloidi e inoltre mantiene la capacità di differenziare, sia *in vivo*, che *in vitro* in cellule mature, sotto gli adeguati stimoli citochinici (36).

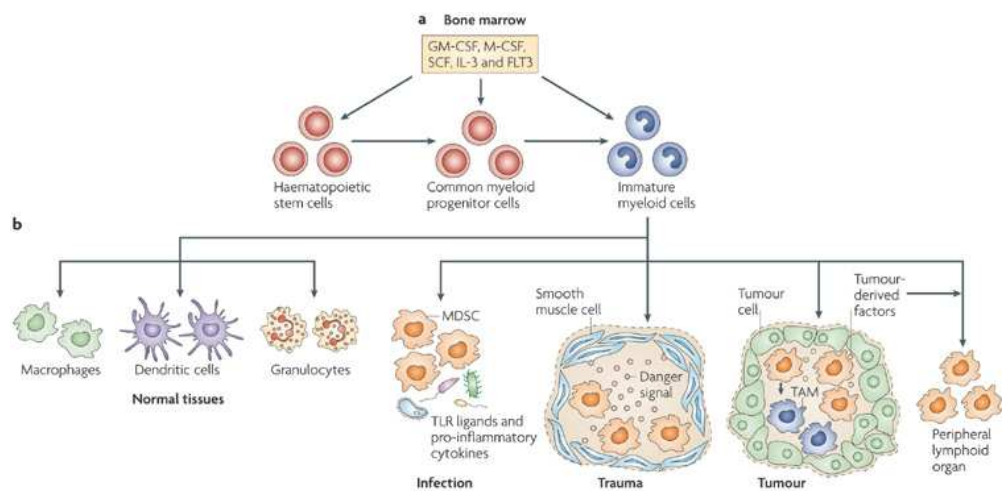


Figura 3. Origine delle MDSC. a) Le cellule mieloidi prendono origine dal midollo osseo da cellule staminali ematopoietiche che differenziano in progenitori comuni mieloidi sotto l'azione di fattori di crescita solubili. b) Mentre in condizioni fisiologiche le cellule mieloidi immature sono in grado di maturare completamente, in presenza di determinati stimoli, il processo di differenziamento può essere interrotto e da queste cellule prendono origine le MDSC che, dopo essere migrate agli organi linfoidi secondari sotto l'azione dei fattori tumorali, sono in grado di sopprimere la risposta immunitaria. Le MDSC possono dare origine ai TAM in prossimità del microambiente tumorale (tratto da Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system, Gabrilovich, Nature review immunology, 2009).

5.1 MDSC nei modelli murini

Nel topo le MDSC sono caratterizzate dalla co-espressione degli antigeni Gr-1 e CD11b. Recentemente l'utilizzo di anticorpi che legano due distinti epitopi del Gr-1, ha permesso di identificare due subset di MDSC, uno costituito da cellule con fenotipo granulocitario ($CD11b^+LY6G^+LY6C^{low}$) e uno rappresentato maggiormente da cellule di origine monocitaria ($CD11b^+LY6G^-LY6C^{high}$); questi due subset svolgono diverse funzioni nei tumori, nelle malattie infettive e autoimmuni e usano diversi meccanismi di soppressione (37-40). Negli ultimi anni numerosi altri marcatori di superficie sono stati identificati allo scopo di caratterizzare analiticamente le sottopopolazioni soppressive coinvolte nei meccanismi di tolleranza; alcuni esempi sono rappresentati dal CD80 (o B7.1), CD115 (o M-CSF), CSF-1, F4/80 (41-43). Un marcatore associato alle MDSC è CD124 che codifica per la catena α del recettore dell'IL-4 (IL4R α); è stato dimostrato che l'acquisizione dell'espressione di tale proteina è associata all'acquisizione della funzione

soppressoria (41). Nel topo, le MDSC si accumulano nel midollo, nella milza, nel tumore, nel sangue periferico.

5.2 MDSC nei pazienti neoplastici

Gli studi condotti in pazienti affetti da tumore hanno dimostrato che il fenotipo delle MDSC isolate da sangue periferico sembra essere tipicamente CD11b⁺, CD33⁺, CD34⁺, CD14⁻, HLA-DR⁻, Lin⁻, CD15⁺, ma l'assenza nell'uomo di un marcatore omologo al Gr-1 ha reso difficile l'identificazione di un target molecolare univoco per le MDSC (44-48). I primi studi furono condotti negli anni '90 su pazienti con tumore della testa e del collo ed indicarono un aumento della popolazione CD34⁺ (49-51). Successivamente Gabrilovich dimostrò che la drammatica riduzione del numero di DC in pazienti affetti dal tumore della testa e del collo era accompagnata da un aumento di cellule mieloidi con caratteristiche di immaturità nel sangue periferico. Solo il 2% di queste cellule però era rappresentato da cellule progenitrici ematopoietiche CD34⁺, mentre il 60% della popolazione risultava CD13⁺. Inoltre mentre il 30% della popolazione esprimeva il CD115, il recettore del M-CSF, la stessa proporzione di cellule esprimeva il CD11c. Infine il 20% della popolazione era positiva per HLA-DR, marcatore espresso dalle DC immature. Quindi da questo studio emerse che le cellule con attività immunosoppressoria isolate dal sangue di pazienti con tumore erano rappresentate per un terzo da cellule macrofagiche e dendritiche e per due terzi da cellule agli stadi precoci del differenziamento mieloido (52). Tali cellule, che potevano essere differenziate in DC mature in presenza di acido all-*trans* retinoico (ATRA), erano in grado di inibire le risposte antigene-specifiche delle cellule T. Per di più è stato osservato che l'ATRA riduce il numero delle MDSC inducendo un miglioramento della risposta immunitaria, sia in pazienti con tumore, che in modelli murini (46, 53). In uno studio recente sono stati studiati i meccanismi di azione dell'ATRA, che sembra agire attraverso l'aumento della sintesi del glutatione e una diminuzione dei ROS nelle MDSC. In questo studio le MDSC da pazienti con carcinoma renale sono state identificate come cellule Lin⁻, HLA-DR⁻, CD33⁺ o CD33⁺, CD14⁻, CD11b⁺ (54). Un altro studio inoltre, condotto in pazienti con tumore renale, ha dimostrato l'aumento di una popolazione CD33⁺ HLA-DR⁻, capace di sopprimere la risposta

antigene-specifica delle cellule T, attraverso la secrezione di ROS e NO (*nitric oxide*). L'utilizzo della catalasi, della superossido dismutasi e dell'ATRA bloccano l'effetto inibitorio esercitato dalle MDSC (55).

Un'altra interessante osservazione sulle MDSC umane emerse dagli studi del gruppo di Ochoa che nel 2005 dimostrò in pazienti con carcinoma renale la presenza di MDSC con fenotipo CD11b⁺, CD14⁻ e CD15⁺, con morfologia e fenotipo dei polimorfonucleati, e non di macrofagi o cellule dendritiche come descritto precedentemente. Tale popolazione esprimeva alti livelli di arginasi I e la deplezione di L-arginina era in grado di inibire la risposta linfocitaria, con riduzione della proliferazione, della produzione delle citochine e della catena ζ del CD3 (56). Lo stesso gruppo più recentemente ha chiarito che tale popolazione di cellule polimorfonucleate attivate esprime alti livelli di CD66b, CD11b, VEGFR1 e bassi livelli di CD62L e CD16 (47). Una popolazione simile di granulociti attivati era stata descritta precedentemente in pazienti con tumore pancreatico (57, 58). Quindi anche questi studi nell'uomo fanno emergere un' apparente doppia identità delle MDSC che in alcuni studi vengono caratterizzate come appartenenti alla filiera monocitaria, ed in altri invece come cellule più simili ai granulociti.

Un altro studio di un gruppo italiano condotto nel 2007 su pazienti con melanoma e carcinoma colon-rettale ha dimostrato la presenza di una popolazione soppressoria CD14⁺ HLADR⁻, in grado di secernere TGF- β , indotta dalle microvescicole rilasciate dalle cellule tumorali (59). Lo stesso gruppo nel 2007 ha identificato una popolazione con le stesse caratteristiche in pazienti con melanoma metastatico, la cui presenza correlava con la somministrazione di un vaccino anti-tumorale contenente GM-CSF; in questa popolazione non sembra essere coinvolto l'aumento dell'espressione di arginasi e nitrossido sintetasi (44).

Una popolazione simile, ma con alta espressione di arginasi è stata identificata in pazienti con carcinoma epatocellulare, anche se l'immunosoppressione osservata in questi pazienti sembra essere la conseguenza non solo dell'azione diretta delle MDSC, ma anche dall'induzione da parte delle MDSC di una popolazione CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, in grado di rilasciare IL-10 (45). Questa osservazione è molto interessante, in quanto fa emergere una possibile rete di interazioni tra popolazioni regolatorie *in vivo*, precedentemente già osservata nel topo (60). Lo stesso gruppo ha

successivamente dimostrato che le MDSC inibiscono la citotossicità e la secrezione di citochine delle NK autologhe in pazienti con epatocarcinoma (61).

La presenza delle MDSC sembra correlata allo stadio clinico e all'estensione metastatica, come recentemente dimostrato in un gruppo di pazienti con diversi tipi di tumore (62).

Un altro gruppo ha valutato gli effetti del Sunitinib sulla riduzione delle popolazioni soppressorie $CD33^+HLA-DR^-$ e $CD15^+CD14^-$ in pazienti con carcinoma renale metastatico (63).

Uno studio condotto su pazienti con tumore NSCLC (*non-small cell lung carcinoma*) ha evidenziato l'espansione di una popolazione soppressoria $CD11b^+$, $CD14^-$, $CD15^+$, $CD33^+$, $IL4R^+$, $IFN-\gamma R^+$ (64). Infine in pazienti affetti dallo stesso tipo di tumore e sottoposti a vaccini per riattivare i linfociti $CD4^+$ tumore specifici, Srivastava ha identificato MDSC con fenotipo $CD11b^+CD33^+CD15^+$ (48).

L'espansione delle MDSC è indotta da fattori rilasciati dalle cellule tumorali e per questo motivo il fenotipo delle cellule soppressorie dipende dal microambiente in cui tali cellule si trovano a svolgere la loro funzione inibitoria. Dal momento che la popolazione mieloide contiene molti diversi tipi cellulari e che la differenziazione mieloide è un processo continuo, le MDSC possono effettivamente avere diversi marcatori di superficie che riflettono i vari stadi del differenziamento mieloide. Tale eterogeneità suggerisce che potrebbe non esserci un marcatore univoco per definire precisamente le MDSC e che l'unica caratteristica comune identificativa oltre all'origine mieloide è la funzione biologica di soppressione della risposta immunitaria.

5.3 MDSC: evidenze in patologie non tumorali

Gli studi condotti nel campo delle MDSC si sono focalizzati principalmente nei modelli murini con tumore o in pazienti neoplastici. Ci sono tuttavia numerose evidenze che le MDSC sono in grado di regolare le risposte durante altri tipi di malattie. Esempi sono rappresentati dall'espansione delle MDSC in modelli murini affetti da infezioni da *Mycobacterium Tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi*, durante toxoplasmosi acuta, sepsi polimicrobica, infezione acuta con *Listeria Monocytogenes*, infezione cronica con *Leishmania major* e infezione con elminti, *Candida albicans* e *Porphyromonas gingivalis* (35). Inoltre un aumento del numero

delle MDSC è stato riscontrato in un modello murino di sclerosi multipla affetto da encefalopatia autoimmune, in un modello di malattia infiammatoria intraoculare affetto da uveoretinite autoimmune e in modello di stress traumatico.

5.4 I fattori coinvolti nell'espansione delle MDSC

L'espansione delle MDSC è influenzata da proteine prodotte principalmente dalle cellule tumorali che stimolano il processo di mielopoiesi inibendo contemporaneamente la completa maturazione mieloidi. Alcuni di questi fattori sono la ciclossigenasi 2, le prostaglandine, il GM-CSF, l'IL-6, l'SCF (*stem cell factor*), l'M-CSF, il VEGF (65).

In numerosi studi è stato dimostrato che l'IL-1 β induce l'accumulo delle MDSC e che i tumori secernenti tale citochina si rivelano più aggressivi (66). L'effetto dell'IL-1 β sull'espansione delle MDSC potrebbe dipendere dall'IL-6, dal momento che tali cellule non esprimono il recettore di IL-1, ma quello di IL-6, che è a sua volta attivata da IL-1. Inoltre IL-1 β regola l'interazione tra MDSC e macrofagi.

PGE₂ (*prostaglandin E 2*) è un potente mediatore dell'infiammazione prodotto dalle cellule tumorali e dai macrofagi e sia in modelli murini, che in pazienti affetti da carcinoma renale è stato dimostrato il suo ruolo nell'induzione delle MDSC (67, 68).

Le proteine S100A8 e S100A9 appartengono alla famiglia di proteine S100 che legano Ca²⁺ e rivestono un ruolo molto importante nell'infiammazione. Gli eterodimeri S100A8/9 sono rilasciati da neutrofilo e monociti attivati e sono in grado sia di bloccare la differenziazione dei precursori mieloidi in macrofagi e DC mature, sia di attrarre le MDSC nel sito tumorale (69, 70).

Infine anche il sistema del complemento svolge una funzione principale nel regolare l'espansione delle MDSC; infatti C5a attrae per chemiotassi le MDSC con caratteristiche granulocitarie, mentre aumenta l'espressione di specie reattive dell'ossigeno nelle MDSC monocitarie (71).

Tutti questi fattori che regolano l'espansione delle MDSC convergono su STAT-3, la cui attivazione persistente previene la differenziazione delle cellule mieloidi in forme mature.

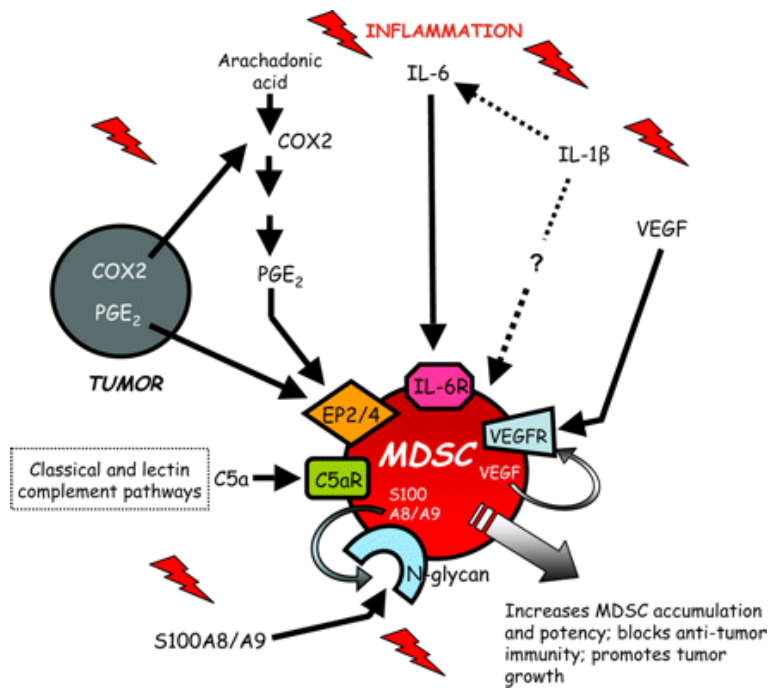


Figura 4. Espansione delle MDSC. Le MDSC si accumulano nel sangue, nel midollo osseo, nei linfonodi e nel tumore in risposta a molecole infiammatorie prodotte dalle cellule tumorali (tratto da Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer, Ostrand-Rosenberg, The Journal of Immunology, 2009).

5.5 Attivazione delle MDSC

Le cellule T e le cellule tumorali stromali rilasciano fattori proteici che hanno ruolo nel processo di attivazione delle MDSC. Alcuni esempi sono rappresentati da IFN- γ , IL-4, IL-13, TGF- β e i ligandi per i recettori Toll-like, che attivano i segnali dei fattori di trascrizione STAT-1, STAT-6 e NF- κ B.

In alcuni studi è emerso che il blocco delle funzioni di IFN- γ e di STAT-1 diminuisce la funzione inibitoria esercitata dalle MDSC (72). Altri studi hanno dimostrato che l'attivazione della via di trasduzione di IL4-R α e STAT-6 mediata dalle citochine IL-4 e IL-13 aumenta la soppressione mediata dalle MDSC (73); inoltre lo stesso meccanismo può essere responsabile della produzione di TGF- β indotta dall'IL-13 (74).

5.6 Meccanismi di soppressione utilizzati dalle MDSC

Numerosi studi hanno dimostrato che le MDSC inibiscono la funzione immunitaria mediante il contatto cellula-cellula, si pensa però che la loro funzione inibitoria venga esercitata non solo attraverso recettori di superficie, ma anche attraverso mediatori solubili.

Le MDSC sono capaci di alterare sia la risposta immunitaria innata che adattativa, inibendo l'attivazione di cellule NK e di linfociti CD4⁺ e CD8⁺ sia in modo antigene dipendente, che in modo antigene indipendente.

I primi studi sulle MDSC misero in evidenza che la soppressione mediata dalle MDSC dipende dal metabolismo della L-arginina, un amminoacido semiessenziale che è il substrato di due enzimi espressi dalle MDSC: l'arginasi I, che produce urea e ornitina e la nitrossido sintetasi inducibile (iNOS), che genera NO (75). L'attivazione dell'arginasi comporta una diminuzione dell'arginina nel microambiente tumorale con conseguente diminuzione della catena ζ del CD3 dei linfociti T, della ciclina D3 e della CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*) (76, 77). Invece la produzione di NO comporta la soppressione delle funzioni delle cellule T, mediante meccanismi che coinvolgono l'inibizione di JAK3 (*Janus kinase 3*) e STAT5, la diminuzione delle molecole MHC II (*major histocompatibility complex II*) e l'induzione dell'apoptosi (78-80).

Studi recenti hanno mostrato sia in modelli murini che in pazienti che le MDSC possono produrre ROS, un processo che è favorito dal rilascio di fattori tumorali, come IL-3, IL-6, IL-10, TGF- β , PDGF e GM-CSF. Inoltre più recentemente sta emergendo che i perossinitriti, il prodotto della reazione chimica tra NO e l'anione superossido, sono presenti nei siti dove le MDSC e le cellule infiammatorie si accumulano e il loro ruolo sarebbe quello di indurre la nitrosilazione dei residui di tirosina del TCR (*T cell receptor*) dei linfociti T, causandone l'alterazione dei siti di legame per l'antigene e quindi l'insensibilità alla stimolazione antigenica (81).

E' inoltre probabile che diversi *subsets* di MDSC agiscano in modi diversi: infatti in alcuni studi è emerso che il *subset* granulocitario esprime alti livelli di ROS e poco NO, al contrario di ciò che è stato osservato per il *subset* monocitario,

nonostante sia la produzione di ROS che quella di NO siano dipendenti da IFN- γ (82).

Le MDSC sono in grado di diminuire l'espressione di L-selectina, una proteina della membrana plasmatica importante per il processo di *homing* dei linfociti *naive* ai linfonodi, dove avviene il riconoscimento antigenico e l'attivazione (83). Inoltre le MDSC bloccano l'attivazione delle cellule T, diminuendo la concentrazione della cisteina nel microambiente tumorale (65).

Le MDSC rivestono un ruolo importante anche nell'angiogenesi: infatti, in modelli murini, non solo l'iniezione di cellule tumorali insieme a cellule CD11b⁺Gr-1⁺ isolate da tumore o dalla milza dell'animale portatore di tumore induce un aumento della densità dei vasi sanguigni, ma le MDSC possono anche differenziare in cellule CD31⁺, contribuendo in questo modo alla generazione di nuovo endotelio (84). Inoltre è stato osservato che la refrattarietà del tumore al trattamento con anticorpi anti-VEGF, dipende dal reclutamento di MDSC (85).

Recentemente è stata osservata anche la capacità delle MDSC di indurre cellule Treg e a seconda del sottotipo di MDSC implicate, l'espansione delle Treg può richiedere la produzione di IL-10 o TGF- β da parte delle MDSC, oppure di arginasi (42, 60).

La modalità con cui le MDSC interagiscono con le NK è piuttosto controversa, mentre è più chiaro che le NKT invarianti limitano l'espansione delle MDSC, mentre le NKT di tipo II ne favoriscono l'espansione mediante la produzione di IL-13 (31, 86, 87).

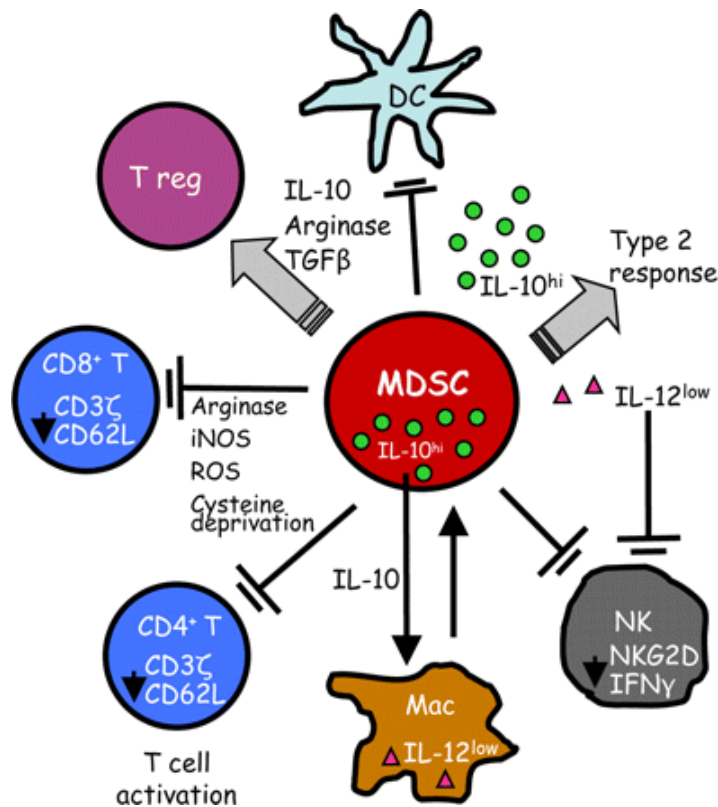


Figura 5. Meccanismi di soppressione delle MDSC. Le MDSC sopprimono l'attivazione dei linfociti T mediante la produzione di ariginasi e ROS, la nitrosilazione del TCR, la deprivazione di cisteina, l'induzione delle Treg. L'immunità innata viene alterata attraverso la diminuzione della produzione di IL-12 da parte dei macrofagi, l'aumento della produzione di IL-10 da parte delle MDSC, l'inibizione della citotossicità delle NK e la diminuzione della quantità di DC, in grado di presentare gli antigeni tumorali (tratto da Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer, Ostrand-Rosenberg, The Journal of Immunology, 2009).

5.7 Specificità antigenica della soppressione mediata dalle MDSC

Una questione che non è stata ancora risolta nell'ambito della caratterizzazione molecolare dell'attività inibitoria esercitata dalle MDSC riguarda la specificità antigenica della soppressione.

Numerosi studi *in vitro* hanno mostrato che i meccanismi di soppressione immunitaria mediati dalle MDSC sono indipendenti dalla specificità antigenica (88, 89). Tuttavia sembra che *in vivo* la situazione sia più complessa e che la specificità antigenica sia necessaria per prolungare il contatto cellula-cellula tra cellula presentante l'antigene e cellula T (90, 91), in modo che ROS e perossinitriti prodotti dalle MDSC possano alterare più facilmente le molecole di superficie linfocitarie. D'altra parte numerose evidenze suggeriscono che le MDSC sono in grado di processare i TAA e presentarli alle cellule T. In uno studio condotto qualche anno fa

l'utilizzo *in vitro* di anticorpi contro le molecole MHC di classe I induceva una riduzione della funzione soppressoria delle MDSC nei confronti dei linfociti CD8⁺ e molto più recentemente in un modello di tumore sporadico è stato osservato che la popolazione di MDSC indotte dal tumore non è in grado di alterare la funzione della risposta dei CD8⁺ non antigena-specifica (92, 93). Non è ancora chiaro se meccanismi simili sono sfruttati dalle MDSC per inibire i linfociti CD4⁺, sia perché la maggior parte degli studi si sono focalizzati sulla soppressione dei CD8⁺, sia perché è veramente molto piccolo il numero di MDSC che esprimono MHC II in molti modelli tumorali. La dipendenza antigenica della soppressione mediata dalle MDSC spiegherebbe il fatto che sia in modelli murini, che in pazienti affetti da tumore, i linfociti T mantengono la loro capacità di rispondere agli altri stimoli.

Infine bisogna considerare che la natura dei meccanismi di immunosoppressione indotta dalle MDSC può essere diversa a seconda che tali cellule agiscano nel sito del tumore o in periferia. Infatti in prossimità delle cellule tumorali, le MDSC aumentano l'espressione degli enzimi arginasi I e NOS, diminuiscono la produzione di ROS e differenziano in TAM, che a loro volta producono citochine tolerogeniche.

5.8 MDSC come target terapeutico

Dal momento che le MDSC si sono rivelate una delle componenti cellulari più aggressive nei confronti del sistema immunitario e una delle cause principali della tolleranza immunitaria nei confronti del tumore, attualmente sono in atto numerose ricerche volte ad identificare strategie efficaci che consentano di eliminare tale popolazione o di modularne la funzione soppressoria.

Uno degli approcci più promettenti è quello di promuovere la differenziazione delle MDSC in cellule mieloidi mature. Un esempio è rappresentato dall'ATRA, un derivato della vitamina A, che inducendo la differenziazione delle MDSC in cellule dendritiche e macrofagi, sia *in vivo* che *in vitro*, riduce drammaticamente l'espansione delle MDSC (53, 54).

Un'altra possibilità per controllare l'effetto soppressorio esercitato dalle MDSC potrebbe essere la neutralizzazione dei fattori tumorali che ne determinano l'espansione. Alcune strategie recenti sono l'inibizione del segnale del SCF, del VEGF e della metalloproteinasi 9 (94-96).

L'utilizzo di piccole molecole farmacologiche allo scopo di limitare le molecole prodotte dalle MDSC e coinvolte nell'immunosoppressione ha dato dei risultati soddisfacenti: gli inibitori della ciclossigenasi 2 riducono l'espressione dell'arginasi I, mentre gli inibitori della fosfodiesterasi 5 e la nitroaspirina diminuiscono l'espressione di arginasi I e di iNOS, contribuendo in questo modo ai processi di infiltrazione ed attivazione delle cellule T e alla riduzione della progressione tumorale (56, 97-99).

Purtroppo la strategia di deplezione completa della popolazione delle MDSC non sembra attualmente perseguibile, a causa dell'assenza di marcatori specifici.

5.9 Il ruolo di G-CSF e GM-CSF nella regolazione della risposta immunitaria

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che la citochina GM-CSF abbia un ruolo fondamentale nell'induzione della soppressione mediata dalle MDSC. Infatti, molte linee cellulari umane e murine rilasciano spontaneamente GM-CSF nel surnatante di coltura; inoltre la somministrazione *in vivo* di GM-CSF è sufficiente ad indurre un aumento di MDSC e la conseguente alterazione della risposta dei linfociti CD8⁺ (100). In uno studio recente è stato dimostrato che il silenziamento del GM-CSF in carcinoma mammario induce la scomparsa della popolazione delle MDSC e dell'immunosoppressione indotta dal tumore (101). Bisogna comunque ricordare che il ruolo di GM-CSF come fattore di crescita implicato nell'immunità antitumorale è stato oggetto di controversie; infatti è stato anche utilizzato come adiuvante in molti vaccini tumorali con lo scopo di attivare la risposta immunitaria stimolando il reclutamento e la maturazione delle DC, l'attivazione dei macrofagi, dei granulociti e delle NKT e migliorando la presentazione antigenica degli antigeni tumorali ai linfociti T. Oggi si ritiene che la spiegazione di questa apparente contraddizione sia da ricercare nella quantità di citochina impiegata, e cioè che il GM-CSF possa aumentare la risposta antitumorale quando viene somministrato ripetutamente a basse dosi, mentre abbia un effetto opposto quanto utilizzato ad alte dosi (44, 102, 103).

Il G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) è un fattore di crescita ematopoietico che stimola il differenziamento e la proliferazione delle cellule staminali ematopoietiche, induce la ricostituzione granulocitaria dopo la mielosoppressione indotta da radiazione o chemioterapia e determina la mobilitazione dei precursori ematopoietici dal midollo osseo al sangue periferico.

Tuttavia, numerosi studi hanno mostrato che il G-CSF ha ruolo nell'induzione della tolleranza attraverso la mobilitazione delle Treg, l'espansione di progenitori mieloidi e cellule dendritiche dotate di attività tolerogenica, e l'aumento dell'attività citolitica delle NKT (104).

Da numerosi studi emerge quindi che sia il GM-CSF che il G-CSF sono in grado di promuovere la progressione tumorale sia *in vitro* che *in vivo* (105-107), nonostante siano anche utilizzati nella terapia anti-tumorale per il loro ruolo come fattori che regolano il reclutamento, la proliferazione e la maturazione di granulociti e macrofagi.

2. SCOPO DEL LAVORO

Da lungo tempo gli studi sull'immunologia dei tumori hanno dimostrato che il sistema immunitario ha la capacità di riconoscere le cellule tumorali ed eliminarle; tuttavia le cellule neoplastiche sono in grado di sfruttare diversi meccanismi per sfuggire all'attacco del sistema immunitario; tra questi vi è l'espansione di cellule tollerogeniche, che favoriscono la crescita tumorale. Tra tali popolazioni le cellule soppressorie di derivazione mieloide rappresentano una popolazione eterogenea di cellule di origine mieloide, che comprende progenitori mieloidi e cellule mieloidi immature, dotate di attività immunosoppressoria. L'espansione e l'attivazione delle MDSC è influenzata da proteine prodotte principalmente dalle cellule tumorali che stimolano il processo di mielopoiesi inibendo contemporaneamente la completa maturazione mieloide. Negli ultimi anni, diversi studi hanno dimostrato l'espansione di MDSC nel sangue di pazienti affetti da tumore; in alcuni studi tali cellule avevano caratteristiche monocitarie, mentre in altri avevano morfologia e marcatori dei granulociti.

Il primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di verificare l'espansione di popolazioni mieloidi in pazienti affetti da tumore, di verificarne l'attività funzionale di soppressione della risposta immunitaria ed infine di individuare e caratterizzare nuovi marcatori di superficie.

Il secondo obiettivo del lavoro è stato quello individuare e caratterizzare le combinazioni di fattori di crescita ematopoietici fondamentali per indurre *in vitro* MDSC a partire da cellule di midollo osseo. Diversi dati in letteratura mostrano che il GM-CSF e il G-CSF sono in grado di promuovere la progressione tumorale sia *in vivo*, che *in vitro*; inoltre entrambe le citochine sono le principali responsabili della differenziazione dei monociti e dei granulociti da precursori midollari. Inoltre alti livelli di IL-6 sono stati identificati in molti tipi di tumore e sono stati associati ad una cattiva prognosi; ulteriori evidenze suggeriscono che IL-6 potrebbe essere rilasciata abbastanza precocemente durante lo sviluppo neoplastico sia dalle cellule trasformate, sia dalle cellule mieloidi infiltranti il tumore.

Sulla base di queste premesse, abbiamo messo a punto un sistema di coltura *in vitro* per indurre MDSC da cellule progenitrici utilizzando una combinazione delle citochine G-CSF, GM-CSF e IL-6. Le cellule soppressorie così derivate (BM-MDSC) sono poi state utilizzate per caratterizzare i meccanismi molecolari alla base della soppressione.

Infine, abbiamo indagato il coinvolgimento del fattore di trascrizione C/EBP β nello sviluppo e nella funzione delle BM-MDSC, effettuando il *knock down* della proteina mediante infezione con vettori lentivirali e valutando l'impatto funzionale della diminuzione dell'espressione proteica.

3. MATERIALI E METODI

1. Coorte di pazienti affetti da tumore

Dopo aver ottenuto il consenso informato dai pazienti inclusi nello studio, è stato raccolto il sangue periferico da pazienti con metastasi di melanoma (Stadio III–IV; $n = 14$) e carcinoma del colon, con o senza coinvolgimento epatico (Stadio II–IV; $n = 15$). I campioni di sangue periferico sono stati ottenuti anche da individui sani ($n = 20$). Per alcuni pazienti affetti da melanoma, i PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) sono stati congelati e gli esperimenti sono stati ripetuti dopo scongelamento

2. Isolamento PBMC e PMN da sangue periferico di pazienti con tumore e donatori sani

PBMC e PMN (*polymorphonuclear cells*) sono stati isolati dal sangue periferico dei pazienti e dei volontari sani mediante separazione su gradiente di densità di Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare-Amersham). Il sangue, raccolto subito dopo il prelievo in tubi trattati con l'anticoagulante EDTA, è stato diluito 1:2 con PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS, Biowhittaker) e stratificato sul gradiente di densità di Ficoll. Dopo la centrifuga, l'anello contenente i PBMC è stato raccolto, trasferito in una nuova provetta e lavato 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 leucociti è stata prelevata e allo scopo di rimuovere i globuli rossi, le cellule sono state sottoposte alla lisi ipotonica, risospingendole 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. La purezza delle frazioni ottenute è stata controllata mediante analisi citofluorimetrica al FACSCalibur (BD Biosciences) sulla base dei parametri del *forward scatter/side scatter* e la vitalità mediante colorazione con Trypan blue (Sigma-Aldrich). La purezza e la vitalità dei PMN in tutti gli esperimenti condotti è risultata maggiore del 95%.

3. Separazione immunomagnetica della frazione CD14⁺ dai PBMC

Le cellule CD14⁺ sono state separate immunomagneticamente sia dai PBMC dei pazienti sia dai PBMC dei donatori sani, con le microbiglie CD14 (Miltenyi Biotec). L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata al termine della separazione mediante marcatura con l'anticorpo CD14-APC (Biolegend), allo scopo di verificare la purezza delle frazioni CD14⁺ e CD14⁻, ottenute dopo la separazione.

4. Analisi citofluorimetrica dei PBMC e dei PMN isolati da pazienti

Per l'analisi citofluorimetrica dei PBMC e PMN separati dal sangue periferico di pazienti affetti da carcinoma del colon e melanoma sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: CD14-PE e CD15-FITC (BD Biosciences); CD14-APC (Biolegend); IL4R α -PE (CD124) e controllo isotipico da R&D System. L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando CellQuest (BD Biosciences) and FlowJo (Tree Star). Il protocollo di marcatura prevede un lavaggio della sospensione cellulare con una soluzione tampone denominata HCF (*Hanks* per citometria a flusso: 137mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5mM KCl (Sigma-Aldrich), 0.3mM Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich), 0.7mM KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich), 0.4mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich), 0.3mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich), 5mM glucosio (Sigma-Aldrich), 4mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 1mM EDTA (Sigma-Aldrich), con aggiunta di penicillina G potassica cristallizzata 100MU/l e streptomina 100mg/l addizionata di 1% di FBS (*fetal bovine serum*, Gibco). Dopo aver rimosso il surnatante è stata effettuata la marcatura in un volume finale di 50 μ l; prima le cellule sono state incubate con soluzione saturante di human poly IgG 0.2mg/ml (AbD Serotec) per 15 minuti a 4°C. Per l'analisi dell'espressione di CD124 è stata eseguita in parallelo la marcatura con lo stesso isotipo di α -CD124 (IgG_{2A}) per 10 minuti a 4°C. Successivamente aggiungendo gli altri anticorpi, è stata effettuata un'incubazione di 20 minuti a 4°C. Le cellule sono state lavate quindi con il tampone per le marcature e risospese in 250 μ l dello stesso buffer per l'acquisizione dei dati. Per la valutazione dell'espressione dell' α -CD124 è stato sottratto il valore dell'isotipo.

5. Saggio di proliferazione con timidina triziata

La coltura mista linfocitaria (*MLR: mixed lymphocyte reaction*) è stata allestita coltivando 7.5×10^4 PBMC isolati da un donatore sano (*responder*) con 7.5×10^4 PBMC, PMN, CD14⁺ e CD14⁻ (*stimulator*) separate da individui sani o da pazienti affetti da tumore e γ -irradiate (3000 rads), in piastre per colture cellulari da 96 pozzetti a fondo a U (Falcon, BD). Per determinare la funzione immunosoppressoria dei PMN, diverse quantità di PMN γ -irradiati, sono stati aggiunti come terza parte in diluizioni scalari ad una MLR allogenica in cui i PBMC *stimulator* erano autologhi rispetto ai PMN aggiunti. Le colture sono state incubate a 37°C e 5% CO₂ per 6 giorni in RPMI privo di arginina (Biological Industries), e addizionato di 150 μ M arginina e 10% FCS (BioWhittaker), penicillina/streptomicina, and hepes (BioWhittaker). Tutte le colture sono state marcate con 1 μ Ci/pozzetto di ³[H]-TdR (PerkinElmer) per le ultime 20 ore del periodo di incubazione e raccolte mediante un lavatore di piastre da 96 pozzetti (PerkinElmer). La radioattività incorporata è stata misurata con un β -counter (Topcount, microplate scintillation counter, Packard). La proliferazione è stata quantificata valutando il rapporto dell'indice di stimolazione (il rapporto tra la proliferazione dei PBMC in presenza delle cellule CD14⁻ e la proliferazione dei PBMC in presenza dei PBMC) e la percentuale di inibizione, in presenza di PMN.

6. Saggio di proliferazione con CFSE

La proliferazione delle cellule T è stata misurata anche mediante la valutazione della diminuzione dell'intensità di fluorescenza del CFSE (Invitrogen, Molecular Probes). PBMC scongelati sono stati risospesi in PBS a 2×10^7 cellule/ml ed incubati con CFSE ad una concentrazione finale di 2 μ M per 5 minuti at 37 °C. Le cellule sono state quindi lavate ed al termine del lavaggio risospese nel terreno di coltura. PBMC CFSE⁺ sono stati privati della frazione cellulare CD14⁺, mediante separazione immunomagnetica con le microbiglie CD14. Le cellule CD14⁻CFSE⁺ (*responder*) sono state coltivate con o senza le cellule CD14⁺ γ -irradiate in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto, precedentemente rivestite dell'anticorpo monoclonale CD3 alla concentrazione finale di 1 μ g/ml. Dopo 4 giorni, le cellule sono state raccolte, marcate con l'anticorpo CD3-APC (Immunotools, Germany) ed il segnale del CFSE

è stato acquisito con un citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson). La proliferazione cellulare è stata quantificata con il software ModFit LT V3.0 (Verity Software House).

7. Campioni biologici e trattamento *in vitro* con citochine

Il sangue midollare utilizzato in questo studio proviene dal Dipartimento di Oncoematologia Pediatrica dell'Università di Padova da pazienti con sospetto di leucemie o linfomi, da pazienti con leucemie linfatiche dopo il settantottesimo giorno in assenza di recidive o reinduzioni 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 presentano 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.

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 NH₄Cl 15.4mM (Sigma-Aldrich), KHCO₃ 0.1mM (Analytical Carlo Erba), EDTA 0.01mM (Sigma-Aldrich). Dopo un lavaggio, le cellule sono state risospese in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco) addizionato di 10% FBS, hepes, penicillina/streptomocina e β-mercaptoetanololo.

Le cellule così ottenute sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml (Falcon, BD) ed incubate per 4 giorni in incubatore Heraeus a 37 °C, 8% CO₂ in presenza delle combinazioni dei seguenti fattori di crescita: G-CSF ricombinante umano (rhG-CSF, *Granulocyte colony-stimulating factor*) 40 ng/ml (Lenograstim, Sanofi Aventis), GM-CSF ricombinante umano (rhGM-CSF, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) 40 ng/ml (Leucomax, Novartis Farma SpA), IL-6 ricombinante umana (rhIL-6, *Interleukin 6*) 40 ng/ml (PeproTech). Una parte delle cellule è stata mantenuta in coltura, senza l'aggiunta dei fattori di crescita come controllo.

In alcuni esperimenti è stato valutato l'effetto dell'aggiunta di un inibitore di IL-4 e IL-13 della ditta Amgen sulla soppressione mediata dalle BM-MDSC. Questa sostanza è già in uso per patologie asmatiche ed è una molecola contro l'IL4-R umano, dotato di un frammento Fc che ha funzione di stabilizzazione; in grado di bloccare sia IL-4 che IL-13. A questo scopo PBMC CSFE⁺ sono stati stimolati con

anti-CD3 (1µg/ml) e anti-CD28 (5µg/ml), in presenza delle cellule di midollo trattate con le citochine oppure in presenza di alcune frazioni separate immunomagneticamente al termine del trattamento con i fattori di crescita. Durante l'allestimento della coltura è stato aggiunto l'inibitore alla concentrazione di 5µg/ml. La valutazione della proliferazione cellulare è descritta nella sezione 9.

8. 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: CD11b-PECy5, CD16-FITC, CD14-APC, CD15-FITC (BD Biosciences), CD11b-PE (Beckam Coulter), CD3-APC (Immunotools), IL4Rα-PE (CD124) e controllo isotipico (R&D System), secondo quanto descritto precedentemente nella sezione 4.

9. Saggi di proliferazione

Le MLR sono state allestite stimolando PBMC *responder* di un donatore sano con un pool di PBMC *stimulator* γ-irradiati provenienti da 3 diversi donatori, in rapporto 1:1. Alle MLR sono state aggiunte, come terza parte, le cellule di midollo prima o dopo il trattamento con le combinazioni delle citochine γ-irradiate, in diluizioni scalari da 1:1 a 1:16 rispetto ai PBMC *responder*. La valutazione della proliferazione è stata effettuata mediante incorporazione di timidina triziata o mediante incorporazione del CFSE e successiva valutazione del segnale di fluorescenza; i protocolli utilizzati sono rispettivamente quelli descritti in sezione 5 e 6. La proliferazione dei PBMC *responder* è stata valutata anche mediante stimolazione con gli anticorpi monoclonali anti-CD3 (OKT3) e anti-CD28, in presenza delle cellule midollari prima o dopo il trattamento con le citochine. Le piastre da 96 pozzetti a fondo piatto sono state rivestite dell'anticorpo anti-CD3 alla concentrazione di 1µg/ml, mentre l'anticorpo anti-CD28 è stato aggiunto in soluzione al terreno della coltura alla concentrazione finale di 5µg/ml. Dopo 4 giorni, le cellule sono state raccolte, marcate con l'anticorpo CD3-APC (Immunotools). La proliferazione cellulare è stata quantificata con il Software FlowJo (Tree Star). La

percentuale degli eventi della prima e della seconda generazione nel controllo di proliferazione privo dell'aggiunta delle colture di midollo è stato posto uguale a 100 e in relazione a quest'ultimo è stata calcolata la percentuale della proliferazione dei PBMC, in presenza delle cellule di midollo.

10. Marcatura delle colture di BM con CFSE

Le cellule di BM, dopo emolisi, sono state marcate con il CFSE 1 μM prima dell'allestimento delle colture per l'induzione *in vitro* delle MDSC con i fattori di crescita, secondo il protocollo descritto nella sezione 6. Successivamente, le cellule sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti alla concentrazione di 1M/ml e mantenute *in vitro* per 5 giorni con la combinazione G-CSF+GM-CSF, secondo quanto descritto nella sezione 7; come controllo negativo una parte delle colture non è stata sottoposta al trattamento con le citochine. Per verificare che la colorazione con CFSE non inducesse tossicità, l'esperimento è stato condotto parallelamente su colture di midollo non marcate con il CFSE. E' stata quindi effettuata una cinetica della proliferazione delle cellule mieloidi trattate con G-CSF+GM-CSF o prive di tali fattori, marcando le cellule al terzo, quarto e quinto giorno con CD11b-PE e CD16-PECy5 (R&D System) ed osservando il profilo del CFSE. La proliferazione cellulare è stata quantificata con il software FlowJo.

11. Saggio di proliferazione in presenza di inserto (*Transwell*)

Le MLR sono state effettuate stimolando i PBMC *responder* CFSE⁺ con anti-CD3 e anti-CD28 in piastre da 24 pozzetti, secondo quanto descritto nella sezione 9; le cellule di midollo sono state aggiunte a contatto diretto con i *responder* o sono state separate mediante un inserto di 0.4 μm (Falcon, BD). Al termine dei 4 giorni di stimolazione, le cellule sono state raccolte, marcate con CD3-APC per valutare la proliferazione linfocitaria, come descritto nella sezione 9.

12. Analisi dell'espressione della catena ζ del CD3

L'espressione della catena ζ del CD3 dei PBMC stimolati con anti-CD3 ed anti-CD28, in presenza delle cellule di midollo isolate *ex-vivo* o dopo il trattamento

con i fattori ematopoietici è stata valutata mediante marcatura intracitoplasmatica con anticorpi specifici. Al quarto giorno di coltura le cellule sono state raccolte, quindi incubate con la soluzione di saturazione (paragrafo 4) e poi è stata effettuata la marcatura di superficie con gli anticorpi CD8-PerCP (R&D System) e CD3-APC, come descritto nella sezione 4. Dopo un lavaggio è stata effettuata un'incubazione con 100 μ l di soluzione Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences) per 20 minuti a 4°C per fissare e permeabilizzare la membrana cellulare. Sono stati quindi effettuati 2 lavaggi in PBS 0.5 % di BSA e 0.1 % di saponina, al termine dei quali le cellule sono state marcate con 50 μ l di anti-CD3 ζ (Beckman Coulter) o con l'isotipo IgG₁ (R&D System) per 30 minuti. Dopo un lavaggio, le cellule sono state risospese e i campioni marcati sono stati acquisiti al citofluorimetro. L'analisi è stata effettuata sulle cellule CFSE⁺ analizzando il segnale del CD3 ζ nel gate CD3⁺/CD8⁺ e sottraendo il valore dell'isotipo.

13. Separazione immunomagnetica della componente *Lineage* negativa da BM-MDSC

Le colture di BM-MDSC, al quarto giorno di coltura con il G-CSF+GM-CSF, sono state sottoposte ad una separazione immunomagnetica con Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi), secondo le indicazioni della ditta. Tale metodo indiretto di colorazione determina la deplezione delle cellule ematopoietiche mature, come le cellule T, le cellule B, le NK, le cellule dendritiche, i monociti, i granulociti, le cellule eritroidi e i loro progenitori, e permette l'arricchimento delle cellule staminali e dei progenitori più immaturi. Il kit contiene i seguenti anticorpi: CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 e CD235a.

14. Produzione dei vettori virali ed infezione delle BM-MDSC

Per diminuire l'espressione dell'mRNA di C/EBP β sono stati usati due vettori plasmidici lentivirali esprimenti un shRNA per C/EBP β e un shRNA di controllo (Mission shRNA, Sigma Aldrich SHCLND). Particelle virali incompetenti per la replicazione e *self-inactivating* sono state prodotte mediante la trasfezione mediata da Ca₃(PO₄)₂ delle cellule di *packaging* HEK293T. A tale scopo sono stati usati il

vettore plasmidico di trasferimento (per C/EBP β o il vettore di controllo) e i costrutti di packaging del lentivirus HIV: pRSVREV, pMDLg_pRRE e VSV-G. Il supernatante virale è stato raccolto 48 ore dopo la trasfezione, filtrato su filtri da 0.22 μ m (Millipore), ultracentrifugato e titolato con il saggio p24 (Innogenetics).

Dopo 24 ore di coltura in presenza di G-CSF+GM-CSF, le cellule di BM sono state trasdotte con i vettori lentivirali concentrati ad una molteplicità di infezione pari a 20 (MOI: *multiplicity of infection*) per 6 h; le cellule sono state quindi coltivate per altri 3 giorni in presenza dei fattori di crescita. Al termine del trattamento l'efficienza del silenziamento è stata valutata mediante real-time PCR e western blotting.

15. Real Time PCR

L'RNA totale è stato estratto usando il Trizol Reagent, seguendo le indicazioni fornite dalla ditta (Invitrogen). Dopo aver controllato la concentrazione e la qualità dell'RNA estratto mediante lo spettrofotometro NanoDrop a lunghezze d'onda 260 e 280nm, il c-DNA è stato ottenuto mediante retrotrascrizione di 1 μ g di RNA totale utilizzando M-MLV retrotranscription kit (Invitrogen), in accordo con le indicazioni fornite.

L'espressione quantitativa del gene di interesse C/EBP β (*CCAAT/enhancer binding protein β*) e del controllo endogeno GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) è stata determinata mediante TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystem).

La Real Time PCR è stata effettuata su 20 ng di cDNA usando la TaqMan 2X PCR MasterMix (Applied Biosystem), e utilizzando ABI prism 7900HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystem). Il ciclo soglia (Threshold Cycle, Ct) è stato determinato manualmente e l'espressione dell'RNA del C/EBP β è stata calcolata come descritto da Applied Biosystem.

16. Western blotting

La separazione della frazione nucleare è stata effettuata con il kit di separazione NE-PER (Pierce Biotechnology), seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice in presenza di inibitori delle proteasi (Protease Inhibitor cocktail III,

Calbiochem), con ulteriore aggiunta di 0.5mM EDTA, 2mM PMSF (Sigma Aldrich) 1mM NaOV₄ (Sigma Aldrich). Al termine della separazione le frazioni proteiche ottenute sono state quantificate con il metodo Bradford.

20-50 µg di estratto nucleare sono stati separati tramite SDS-Page con un gel al 12% di acrilammide; al termine della corsa elettroforetica è stato effettuato il trasferimento delle proteine su membrana di PVDF (Millipore) per 2h a 4°C. La membrana è stata quindi saturata con PBS-Tween20 0.05% (PBS-T) addizionato di 3% di non-fat dried milk (Sigma Aldrich) per 1 ora a temperatura ambiente. L'ibridazione con l'anticorpo primario è stata fatta incubando la membrana con α -C/EBP β (rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology) in PBS-T con aggiunta di BSA al 3%, over-night a 4°C.

Il giorno dopo l'incubazione con il primario, sono stati eseguiti quattro lavaggi di 10 min con PBS-T, al termine dei quali è stata effettuata dell'ibridazione con l'anticorpo secondario (HRP-conjugated, donkey anti rabbit IgG, GE Healthcare-Amersham) per 1 ora a temperatura ambiente in PSB-T addizionato di 3% non-fat dried milk.

Come controllo di trasferimento e come controllo interno, la membrana è stata re-incubata con anticorpo α -Nucleoporin 62 (mouse momoclonal, NP-62, BD Biosciences).

17. Saggi di proliferazione con BM-MDSC con C/EBP β silenziato.

Dopo avere effettuato il silenziamento mediante infezione virale, al quarto giorno di coltura con G-CSF+GM-CSF, le cellule di midollo sono state utilizzate per l'allestimento della coltura in presenza dei PBMC *responder* CFSE⁺, come descritto precedentemente nella sezione 9. Le cellule di midollo sono state aggiunte in rapporto 2:1 ed 1:1 rispetto ai *responder*.

18. Analisi statistica

Per gli esperimenti condotti sui pazienti con tumore è stato usato il test non parametrico Mann-Whitney per comparare la percentuale delle cellule CD14⁺ o CD15⁺ tra il gruppo degli individui sani rispetto al gruppo dei pazienti con carcinoma del colon e melanoma, il rapporto dell'indice di stimolazione delle cellule CD14⁻

degli individui sani rispetto ai pazienti con tumore ed infine la percentuale dell'inibizione della proliferazione indotta dai PMN dei controlli rispetto ai pazienti. La correlazione di Pearson è stata usata per misurare la correlazione tra le cellule IL4R α ⁺/CD14⁺ o IL4R α ⁺/CD15⁺ e rispettivamente l'indice di stimolazione o la percentuale di inibizione.

Per gli esperimenti condotti sui campioni di midolli i dati 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

1. Espansione di una popolazione di cellule soppressorie di derivazione mieloide in pazienti con carcinoma del colon e melanoma

1.1 Soppressione dell'attivazione linfocitaria da parte di sottopopolazioni leucocitarie

Negli ultimi anni, diversi studi hanno dimostrato l'espansione di MDSC nel sangue di pazienti affetti da tumore; in alcuni studi tali cellule avevano caratteristiche monocitarie, mentre in altri avevano morfologia e marcatori dei granulociti (44, 52, 56). A questo proposito va sottolineato il fatto che in questi studi i granulociti con attività soppressoria sono stati rilevati nella frazione ottenuta dopo stratificazione del sangue su ficoll, in cui tipicamente ricade la frazione mononucleata (PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*) dei leucociti, ma non quella delle cellule polimorfo nucleate (PMN: *polymorphonuclear cells*).

Il nostro studio ha preso spunto da questa osservazione ed abbiamo deciso di studiare l'eventuale espansione di MDSC nel sangue di pazienti con carcinoma del colon e melanoma valutando tutte le sottopopolazioni leucocitarie, inclusi i PMN. Pertanto, per poter prendere in considerazione tutte le possibili fonti di leucociti con potenziale soppressorio abbiamo eseguito tutti i saggi utilizzando sangue appena isolato.

Per valutare l'eventuale attività soppressoria di sottopopolazioni mieloidi, abbiamo allestito delle colture linfocitarie miste (*MLR: mixed lymphocyte reaction*), nelle quali PBMC, cellule CD14⁺ e CD14⁻ separate immunomagneticamente dai PBMC e PMN isolati dai pazienti con tumore ed irradiati sono stati aggiunti come cellule *stimulator* a PBMC *responder* isolati da donatori sani. Dopo sette giorni, alle colture è stata aggiunta timidina triziata e dopo 24 ore di incubazione le colture sono state raccolte per valutarne la proliferazione.

Nella Figura 1a. Si può osservare che le MLR stimulate con i PBMC dei pazienti privati delle cellule CD14⁺ mediante separazione immunomagnetica mostrano una proliferazione significativamente più elevata rispetto alle colture allestite in maniera analoga, ma stimulate con le cellule isolate dal sangue di

individui sani ($p = 0.016$) Questo dato suggerisce quindi che cellule con funzione immunosoppressoria sono presenti tra le popolazioni monocitarie $CD14^+$.

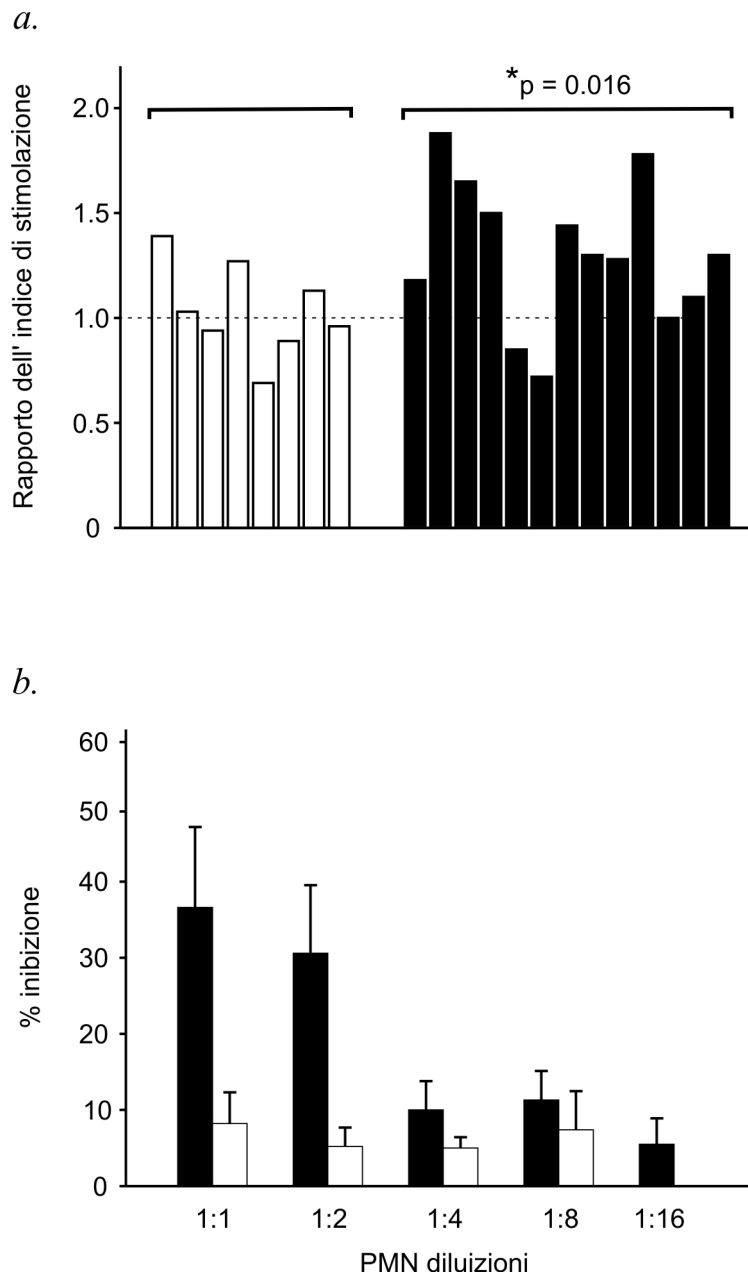


Figura 1
Attività immunosoppressoria di cellule $CD14^+$ e di PMN di pazienti affetti da tumore o da individui sani.

a. Rapporto dell'indice di stimolazione della proliferazione dei PBMC *responder* di individui sani stimolati con PBMC irradiati (indice di stimolazione = 1) o con PBMC depletati delle cellule $CD14^+$ isolate da pazienti con tumore al colon o melanoma (■) o da donatori (□). I risultati sono espressi come rapporto dell'indice di stimolazione, ovvero il rapporto tra la proliferazione delle colture stimolate con le cellule $CD14^+$ e la proliferazione delle colture stimolate con i PBMC non separati. Il valore della p è indicato nella figura.

b. Inibizione della proliferazione linfocitaria dopo aggiunta di PMN. I valori sono espressi come percentuale di inibizione della proliferazione linfocitaria in MLR allogene in cui PBMC *responder*

sono stati stimolati in rapporto 1:1 con PBMC di pazienti affetti da tumore al colon o melanoma (■) o donatori sani (□), in presenza di PMN autologhi con gli stimulator, aggiunti in diluizione. Nella figura è rappresentata la media di 5 esperimenti indipendenti \pm errore standard (SE).

Le MLR stimulate con i PMN mostrano bassi livelli di proliferazione (dati non mostrati); questo fenomeno potrebbe essere spiegato dal fatto che i PMN non sono in grado di presentare l'antigene come i monociti, oppure considerando le capacità citotossiche dei PMN mediate dall'esocitosi dei granuli citoplasmatici in essi contenuti. D'altra parte, come è stato di recente ribadito dagli studi di Ochoa condotti su pazienti con carcinoma renale (47), i PMN potrebbero anche esercitare una funzione inibitoria nei confronti dei linfociti T. Per indagare se anche nei pazienti affetti da carcinoma del colon e melanoma i PMN mostrano questo potenziale immunomodulante, i PMN sono stati aggiunti in diluizione ad una coltura in cui i PBMC *responder* isolati dal paziente venivano stimolati da un pool di PBMC *stimulator* irradiati. Come si può osservare dalla Figura 1b., solo i PMN isolati dal sangue periferico dei pazienti affetti da carcinoma del colon e melanoma mostrano una significativa attività soppressoria, ma non le cellule isolate da individui sani ed inoltre l'inibizione della funzione linfocitaria dipende dal numero di cellule aggiunte in MLR.

Questi dati indicano quindi che nel sangue dei pazienti analizzati esistono due sottopopolazioni mieloidi in grado di sopprimere la proliferazione dei linfociti, una è presente nella frazione CD14⁺, mentre l'altra è contenuta nella frazione granulocitaria.

1.2 Overespressione di IL4R α nei PBMC e nei PMN isolati da sangue periferico dei pazienti

E' stato dimostrato in animali portatori di tumore che la catena α del recettore di IL-4 (IL4R α) è un marcatore utile per discriminare le popolazioni monocitarie con attività immunosoppressoria rispetto alle sottopopolazioni di tipo granulocitario, prive invece di tale funzione inibitoria (41).

Abbiamo pertanto indagato l'eventuale presenza di tale marcatore nelle sottopopolazioni leucocitarie isolate da pazienti con tumore. A tale scopo PBMC e PMN separati da donatori e dai pazienti sono stati marcati con anticorpi anti-IL4R α , e con due marcatori tipici delle cellule mieloidi, CD14 e CD15. Come per la maggior parte dei recettori delle citochine, l'espressione di IL4R α ha una bassa intensità e pertanto abbiamo calcolato la percentuale di cellule positive sottraendo quelle cellule la cui intensità è sotto la curva di controllo dell'isotipo. Nei donatori sani le cellule CD14⁺/IL4R α ⁺ nella frazione monocitaria sono il $7.3 \pm 4.6\%$ (range 1.2-17.5%, Figura 2a., colonna HD, grafico superiore), mentre tra i PMN le cellule CD15⁺/IL4R α ⁺ sono il $3.6 \pm 4.2\%$ (range 0-12.9%, Figura 2a., colonna HD, grafico inferiore).

Quando abbiamo valutato l'espressione di questo marcatore sui leucociti isolati dai pazienti portatori di neoplasia, abbiamo osservato un aumento significativo della percentuale delle cellule mieloidi positive per IL4R α sia tra i PBMC, che tra i PMN rispetto alle cellule isolate da donatori; è da sottolineare però che alcuni pazienti invece hanno dei valori di espressione di questo marcatore del tutto sovrapponibili a quelli dei donatori sani (Figura 2a. e 2b: MFI, intensità media di fluorescenza).

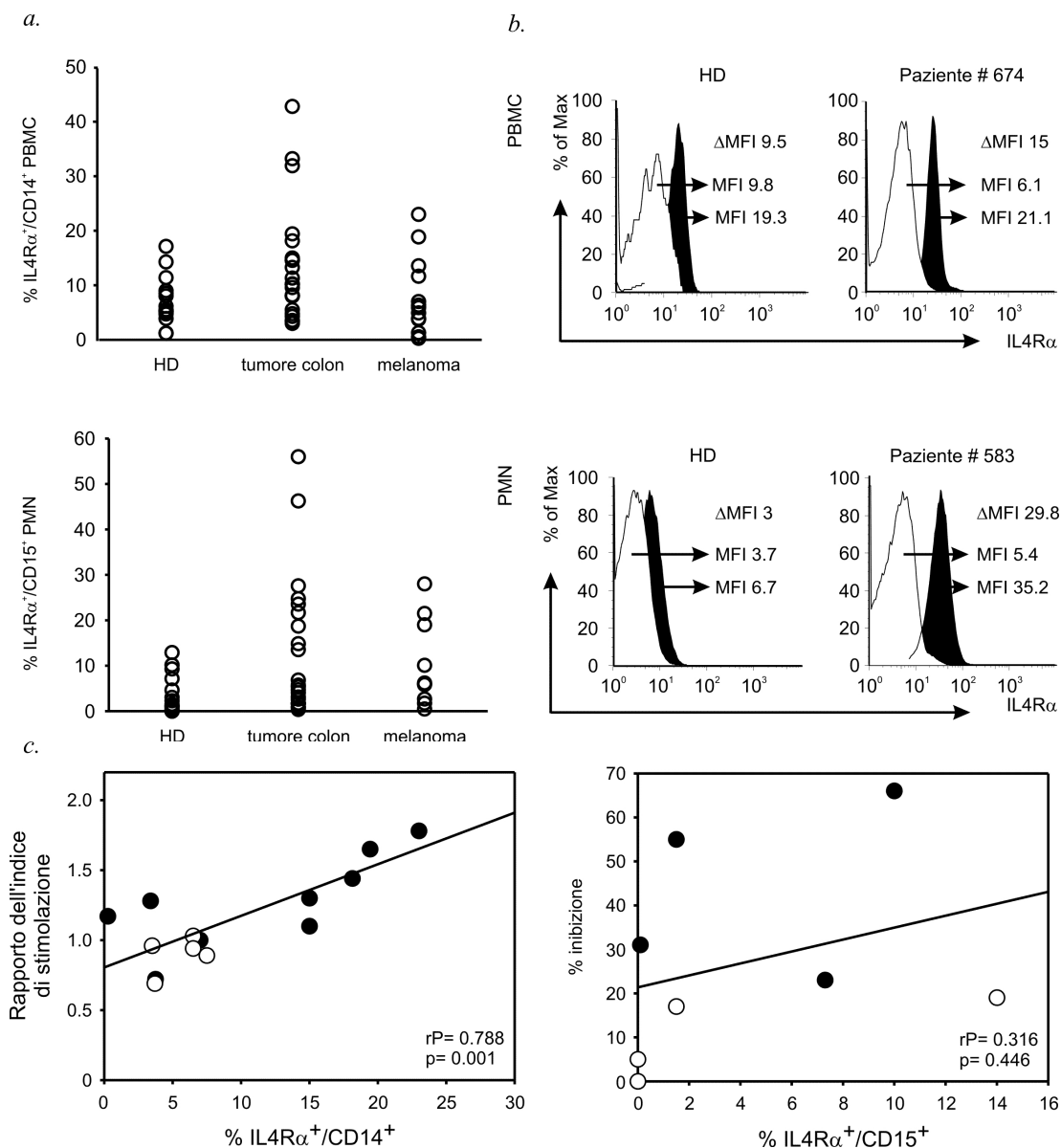


Figura 2

Espansione di cellule IL4R α^+ tra monociti e granulociti di pazienti con tumore e correlazione dell'attività immunosoppressoria con l'espressione di IL4R α .

a. PBMC (pannello superiore) e PMN (pannello inferiore) da individui sani e pazienti con tumore al colon e melanoma sono stati isolati e marcati con gli anticorpi anti-CD14, anti-CD15, anti-IL4R α e controllo isotipico, per la lettura citofluorimetrica. Per calcolare la percentuale di IL4R α tra i monociti, è stato effettuato un gate morfologico nella regione dei monociti e sono state calcolate le cellule IL4R α^+ /CD14 $^+$, dopo aver sottratto il segnale di background misurato con l'isotipo di IL4R α . Per calcolare la percentuale di IL4R α tra i granulociti, è stato effettuato un gate morfologico nella regione granulocitaria e la percentuale di cellule IL4R α^+ /CD15 $^+$ è stata valutata dopo sottrazione del valore dell'isotipo.

b. Esempio rappresentativo di PBMC (pannello superiore) e PMN (pannello inferiore) di un donatore sano (HD) e di pazienti (#674 e #583) con melanoma marcati con gli anticorpi CD14, CD15, e IL4R α . In bianco sono rappresentate le curve del segnale dell'isotipo, mentre in nero è rappresentato il segnale di fluorescenza dell'IL4R α . I valori di MFI (intensità media di fluorescenza) sono indicati in figura.

c. Nel pannello sinistro è mostrata la correlazione tra il rapporto dell'indice di stimolazione e la percentuale di cellule $IL4R\alpha^+/CD14^+$. I PBMC *stimulator* sono stati ottenuti da donatori sani (cerchi bianchi) o da pazienti con tumore (cerchi neri). Nel pannello di destra è mostrata la correlazione tra inibizione della proliferazione dopo aggiunta in MLR di PMN da donatori sani (cerchi bianchi) o da pazienti con tumore (cerchi neri) *vs* percentuale di cellule $IL4R\alpha^+/CD15^+$.

I pazienti che mostrano l'espansione di tale marcatore si trovano dallo stadio II al IV della malattia, come già osservato da altri gruppi (62). Inoltre abbiamo osservato che nei pazienti inclusi nello studio non c'è una correlazione tra i livelli di espressione di $IL4R\alpha$ nei PBMC e nei PMN isolati dallo stesso paziente, perché i livelli dell' $IL4R\alpha$ possono essere alti nei PBMC, ma non nei PMN e vice versa; questo suggerisce che l'espansione delle cellule $IL4R\alpha^+$ potrebbe non essere identificata facilmente nel caso in cui si prendano in considerazione solo i PBMC di pazienti affetti da tumore.

1.3 Correlazione dell'attività immunosoppressoria con l'espressione di $IL4R\alpha$

Per comprendere se l'espansione di $IL4R\alpha$ potesse avere un significato funzionale, abbiamo correlato i dati di proliferazione ottenuti negli esperimenti di MLR con PBMC e PMN isolati da sangue di pazienti affetti da tumore, con i dati di immunofenotipo degli stessi pazienti. Per i dati di proliferazione abbiamo considerato il rapporto dell'indice di stimolazione dopo deplezione delle cellule $CD14^+$ dai PBMC (il rapporto tra proliferazione dei PBMC stimolati con le $CD14^-$ e proliferazione dei PBMC in presenza dei PBMC non sottoposti a separazione immunomagnetica), e la percentuale di inibizione della proliferazione dopo aggiunta dei PMN alla coltura. Nella Figura 2c. è possibile osservare che la funzione immunosoppressoria correla in maniera significativa con la percentuale delle cellule $IL4R\alpha^+$ tra i PBMC ($rP = 0.788$, $p = 0.001$), ma non tra i PMN ($rP = 0.316$, $p = 0.446$).

1.4 Caratterizzazione della proliferazione linfocitaria in presenza di cellule mieloidi soppressorie isolate da pazienti con tumore

Dopo aver dimostrato che in pazienti affetti da carcinoma del colon e del melanoma c'è un'espansione di cellule $CD14^+/IL4R\alpha^+$ in grado di inibire significativamente la proliferazione linfocitaria, abbiamo voluto indagare in maggior

dettaglio come tali cellule fossero in grado di modulare la risposta immunitaria e a questo scopo abbiamo messo a punto un saggio di proliferazione linfocitaria indipendente dall'antigene. Abbiamo quindi marcato i PBMC con il CFSE, una molecola lipofilica dotata di fluorescenza verde in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana cellulare e che ad ogni divisione mitotica si divide nelle due cellule figlie. La fluorescenza è quindi dimezzata ad ogni ciclo cellulare ed attraverso la lettura citofluorimetrica e l'analisi con un apposito software (ModFit), è possibile monitorare il numero di divisioni cellulari. Dopo la marcatura con il CFSE, le cellule sono state stimulate per 4 giorni con un anticorpo monoclonale anti-CD3, uno stimolo mitogenico che induce un'estesa proliferazione dei linfociti. Nella Figura 3 è mostrato un esperimento di proliferazione linfocitaria, in cui abbiamo messo a confronto la proliferazione di PBMC provenienti da 3 soggetti diversi e marcati con CFSE. Per verificare l'eventuale azione soppressoria delle cellule CD14⁺ contenute nei PBMC, abbiamo valutato la proliferazione dei PBMC depletati delle cellule CD14⁺, oppure con l'aggiunta di cellule CD14⁺ autologhe.

I campioni inclusi nell'esperimento derivano da un donatore sano, da un paziente privo di cellule con attività soppressoria e da un paziente con espansione di MDSC. Solo per il paziente #352 le cui cellule CD14⁺ mostrano sia il fenotipo (% di IL4R α ⁺/CD14⁺ elevata) che l'attività (rapporto dell'indice di stimolazione pari a 1.78) delle MDSC, si ha una diminuzione significativa della proliferazione dopo aggiunta delle cellule CD14⁺ autologhe, come è possibile osservare dall'aumento della percentuale delle cellule nella generazione parentale (da 16.9 a 59.2%) e dalla diminuzione delle cellule proliferanti (da 83 a 41%). L'aggiunta invece delle cellule CD14⁺ autologhe isolate da donatore o da paziente privo della componente immunosoppressoria induce un aumento della proliferazione; tale risultato non è sorprendente dal momento che è già noto in letteratura che l'aggiunta di monociti autologhi a colture di linfociti T stimulate con anti-CD3 induce un aumento sostanziale della proliferazione linfocitaria, mentre in assenza di cellule APC, come i monociti, la proliferazione linfocitaria è minore (108).

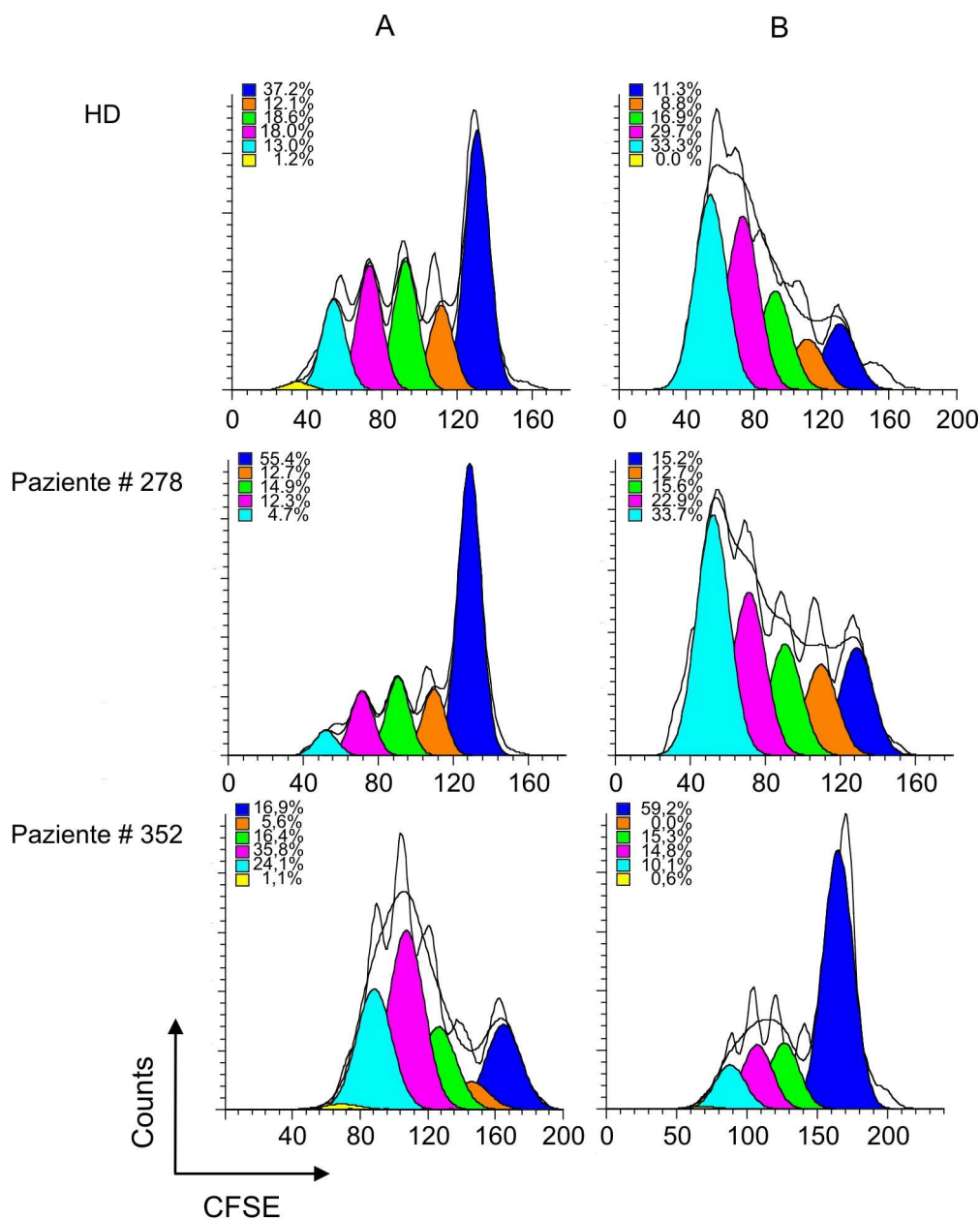


Figura 3
Analisi della divisione cellulare di PBMC depletati delle cellule CD14⁺ e stimolati con l'anticorpo anti-CD3.

PBMC sono stati marcati con CFSE, privati della componente CD14⁺ e stimolati con l'anti-CD3 con (B) o senza (A) CD14⁺ autologhe irradiate aggiunte in rapporto 1:1 rispetto alle cellule CD14⁻. I campioni derivano da un donatore sano (HD), da un paziente privo di cellule con attività soppressoria (paziente #278) e da un paziente con espansione di MDSC (paziente #352). Dopo 4 giorni, le cellule sono state raccolte e colorate con l'anticorpo anti-CD3. Nel grafico sono mostrate le cellule CFSE⁺/CD3⁺; i picchi blu sulla destra indicano le cellule che non sono andate incontro a divisioni cellulari e i picchi sul lato sinistro rappresentano ciascuna divisione cellulare. La percentuale di cellule di ogni generazione è mostrata nel grafico.

2. Induzione *in vitro* di cellule mieloidi con capacità soppressoria mediante trattamento del sangue midollare con citochine

2.1 Analisi di sottopopolazioni mieloidi da sangue midollare

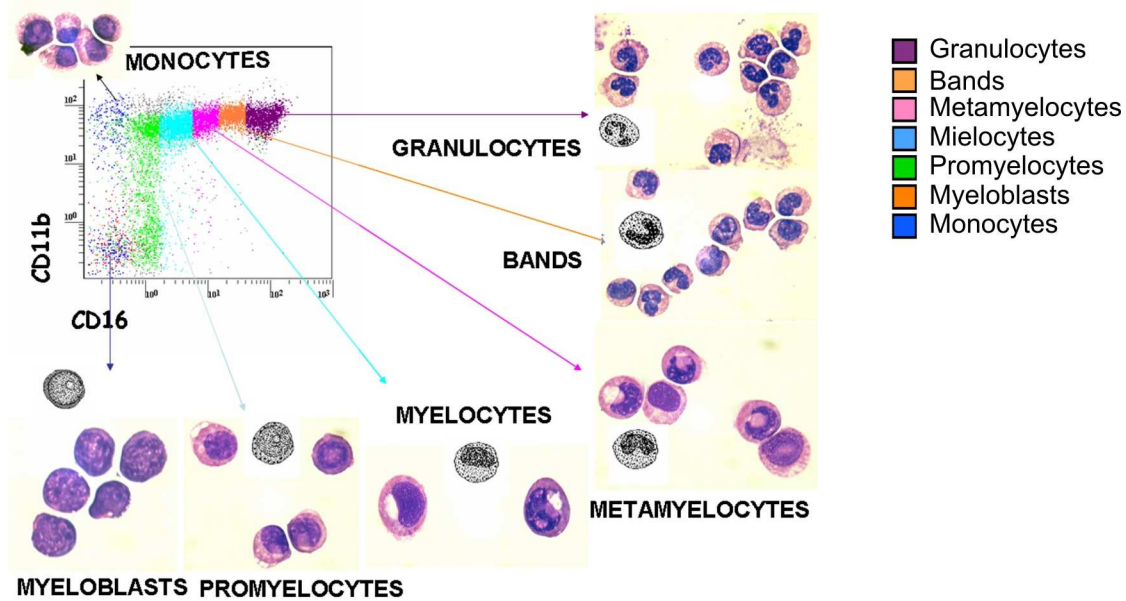
Numerosi studi recenti indicano che le MDSC rappresentano una popolazione eterogenea di cellule di origine mieloide, che comprende progenitori mieloidi e cellule mieloidi immature (35). Inoltre, molti dati sperimentali fanno ipotizzare che le MDSC derivino dal midollo osseo, sotto l'influenza di citochine rilasciate dal tumore.

Abbiamo quindi deciso di indagare se il trattamento con alcuni fattori di crescita ematopoietici potesse indurre i progenitori mieloidi presenti nel sangue midollare umano (BM) proveniente da soggetti sani a differenziare in cellule dotate di capacità soppressoria. A questo scopo abbiamo valutato l'effetto del trattamento delle citochine G-CSF, GM-CSF e IL-6 o della loro combinazione sul differenziamento e sulla funzione biologica delle cellule isolate da BM. La scelta di utilizzare questi fattori di crescita è stata guidata dal fatto che le cellule tumorali sono in grado di rilasciare queste citochine, che a loro volta hanno ruolo nel reclutamento, nella proliferazione e nella maturazione dei precursori granulocitari e monocitari.

Per valutare gli stadi di differenziazione del compartimento mieloide nel sangue midollare, abbiamo utilizzato le combinazioni di diversi marcatori mieloidi come il CD14 con il CD15 ed il CD11b con il CD16 che permettono di caratterizzare lo stadio di maturazione delle cellule mieloidi, valutando sia l'espressione sia l'intensità con cui sono espressi sulla superficie cellulare (109, 110).

Come è possibile osservare in Figura 4a., i mieloblasti, cellule progenitrici della linea mielocitaria, non esprimono i marcatori CD11b e CD16. Il differenziamento dei mieloblasti a granulociti neutrofilici maturi prevede un incremento dell'intensità di espressione dei marcatori CD11b e CD16, in relazione allo stadio maturativo: i granulociti neutrofilici, che rappresentano lo stadio terminale del differenziamento di queste cellule, esprimono CD16 ad intensità più alta rispetto alle cellule a stadi maturativi intermedi.

a.



b.

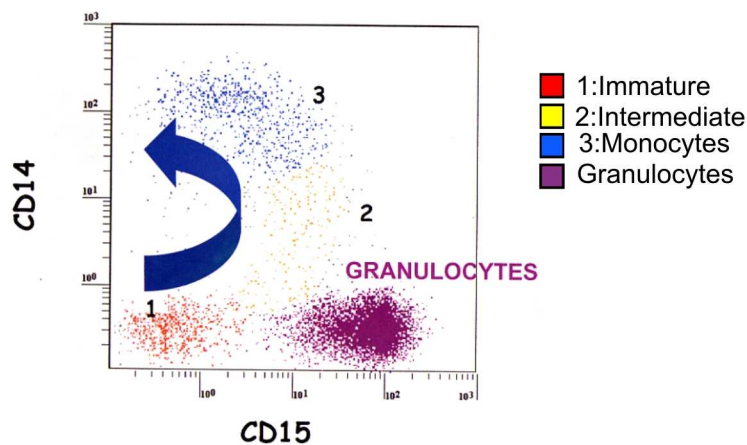


Figura 4

Variazione dell'espressione dei marcatori di superficie CD11b/CD16 e CD14/CD15 durante le fasi di maturazione di popolazioni mieloidi.

a. Analisi del differenziamento della linea mieloide mediante i marcatori CD11b e CD16. I monociti maturi esprimono CD11b, ma risultano negativi per il marcatore CD16. I mieloblasti sono negativi per entrambi i marcatori. I promielociti esprimono CD16 a bassa intensità, mentre esprimono in modo variabile CD11b. Con il procedere della maturazione cellulare, si osserva un aumento nell'intensità dell'espressione del CD16, mentre CD11b rimane costante.

b. Variazione dell'espressione dei marcatori CD14 e CD15 durante il differenziamento dei monociti e granulociti. Le cellule mieloidi immature non esprimono i marcatori di superficie CD14 e CD15 (zona 1). Durante la maturazione si ha un incremento dell'espressione dei due antigeni mediante il quale è possibile distinguere la popolazione dei monociti maturi $CD14^+/CD15^{-low}$ (zona 3) e la popolazione dei granulociti neutrofili $CD15^+/CD14^{-low}$ (zona dei granulociti). Gli stadi maturativi intermedi (zona 2) sono invece caratterizzati dall'espressione intermedia di tali marcatori rispetto alle popolazioni mature (le immagini sono state gentilmente fornite dal Prof. Basso del Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova).

Un'altra coppia di marcatori che abbiamo utilizzato per studiare le popolazioni mieloidi è rappresentata dal CD14 e dal CD15; la marcatura con tali anticorpi divide le popolazioni mielo-monocitarie in quattro aree distinte, come è possibile osservare nello schema della Figura 4b.: le popolazioni immature, le cellule staminali ematopoietiche e le cellule non appartenenti alla linea mieloide come i linfociti, non esprimono né il CD14, né il CD15 e ricadono nella zona 1. La maturazione in senso mielo-monocitario porta ad un incremento nell'espressione di tali marcatori, fino al differenziamento a monociti (zona 3) e a granulociti (zona dei granulociti). I monociti esprimono CD14 ad alta intensità, mentre il CD15 risulta non espresso o espresso a bassa intensità. I granulociti, al contrario, mostrano un profilo fenotipico opposto a quello dei monociti per questi marcatori: infatti esprimono CD15 ad alta intensità, mentre CD14 risulta non espresso o espresso a bassa intensità.

Prima di analizzare l'effetto del trattamento *in vitro* con i fattori di crescita sulle cellule di midollo, abbiamo verificato che effettivamente le cellule mieloidi isolate *ex-vivo* non presentassero né caratteristiche fenotipiche, né funzionali di MDSC.

A tale scopo i campioni di aspirato di sangue midollare, dopo l'emolisi dei globuli rossi, sono stati sottoposti ad un'analisi fenotipica, mediante marcature di superficie con le combinazioni di marcatori sopra descritte; inoltre è stata valutata l'espressione della catena α del recettore dell'IL-4, per verificare i dati ottenuti sui pazienti affetti da carcinoma del colon e melanoma. Tutte le analisi sono state condotte nel *gate* morfologico dove ricadono le cellule mieloidi. Come atteso, la popolazione cellulare derivante da campioni di citoaspirato midollare è costituita da popolazioni mieloidi molto eterogenee a vari stadi di maturazione (Figura 5a.). Il profilo di espressione dei marcatori CD11b e CD16 mostra un pattern differenziativo che va dai precursori più immaturi alle cellule più mature, compresi i granulociti; inoltre la presenza di cellule mature è confermata dalla positività per l'espressione del CD15; gli stadi differenziativi intermedi e i monociti maturi, identificati in base all'espressione del CD14, sono presenti in percentuale minore rispetto ai granulociti, mentre l'espressione dell'IL4R α è trascurabile.

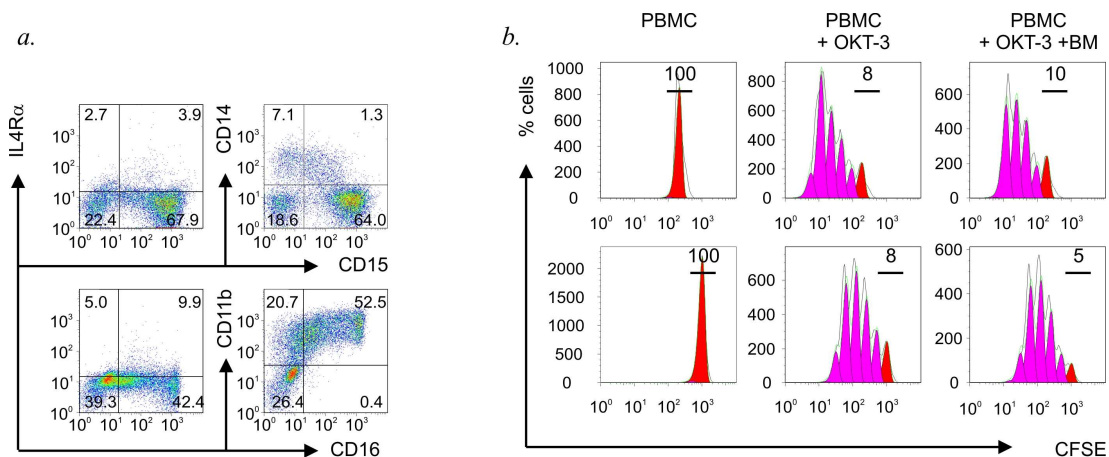


Figura 5
Analisi immunofenotipica e funzionale del sangue midollare *ex-vivo*.

a. Le cellule presenti nel sangue midollare *ex-vivo* dopo emolisi sono state marcate con le combinazioni di anticorpi CD14/CD15 e CD11b/CD16 allo scopo di identificare i vari stadi del differenziamento cellulare e con l'anticorpo IL4R α ed il controllo isotipico. Nel sangue di midollo sono rappresentati tutti gli stadi di differenziazione della filiera mielo-monocitaria, mentre non è presente l'espansione di una popolazione mieloide IL4R α ⁺.

b. Proliferazione linfocitaria in risposta all'anticorpo anti-CD3 in presenza di cellule di aspirato midollare. PBMC *responder* CFSE⁺ sono stati stimolati con l'anticorpo anti-CD3 per 4 giorni (PBMC + OKT3) ed è stata valutata la proliferazione linfocitaria in presenza delle cellule di midollo isolate *ex-vivo* aggiunte in rapporto 1:1 (PBMC+OKT3+BM), mediante l'analisi dei cicli cellulari. Nella figura sono rappresentati due esperimenti indipendenti. Il picco rosso rappresenta la generazione parentale, mentre i picchi rosa rappresentano le generazioni cellulari generate in risposta allo stimolo mitogenico.

Successivamente abbiamo verificato che le cellule isolate da BM non fossero in grado di interferire con la proliferazione linfocitaria.

A tale scopo abbiamo valutato se la proliferazione linfocitaria in risposta all'anticorpo anti-CD3 venisse modificata dall'aggiunta di cellule di midollo separate *ex-vivo*. Abbiamo quindi marcato i PBMC *responder* con il CFSE e li abbiamo stimolati per 4 giorni con l'anticorpo anti-CD3 in presenza o meno di cellule di midollo; al termine della coltura le cellule sono state marcate con un anticorpo anti-CD3 ed abbiamo studiato il profilo del segnale del CFSE, allo scopo di seguire dettagliatamente la divisione cellulare dei linfociti T. Nella Figura 5*b.* sono raffigurati due esperimenti indipendenti dove si può osservare che l'aggiunta delle cellule di midollo non altera la proliferazione dei PBMC attivati.

2.2 Il trattamento del BM con G-CSF, GM-CSF e IL-6 induce popolazioni mieloidi immature dotate di attività soppressoria

2.2.1 Analisi fenotipica del BM dopo trattamento con diverse combinazioni di citochine

Diversi dati in letteratura mostrano che il GM-CSF e il G-CSF sono in grado di promuovere la progressione tumorale sia *in vivo*, che *in vitro*; inoltre entrambe le citochine sono le principali responsabili della differenziazione dei precursori midollari in monociti e dei granulociti, popolazioni che abbiamo ritrovato espanse nel sangue periferico di pazienti con tumore e che sono associate al fenomeno di immunosoppressione.

Allo scopo quindi di identificare i fattori coinvolti nella mobilitazione delle MDSC da cellule progenitrici, abbiamo coltivato le cellule provenienti da midollo osseo con diverse combinazioni di fattori di crescita. Dopo aver effettuato alcuni esperimenti preliminari per definire le condizioni colturali ottimali, le cellule sono state coltivate con G-CSF, GM-CSF o con la combinazione di queste citochine per 4 giorni. Come controllo di ogni esperimento abbiamo mantenuto una parte delle cellule di midollo *in vitro*, senza aggiunta di citochine. Dopo 4 giorni di coltura, abbiamo ripetuto l'analisi fenotipica effettuata *ex-vivo*, allo scopo di evidenziare le differenze modifiche dovute al trattamento con le citochine.

Come si può osservare dalla Figura 6, il trattamento con le diverse combinazioni di fattori ematopoietici induce *pattern* maturativi diversi delle cellule mieloidi, rappresentati dai profili di espressione dei marcatori CD11b e CD16. Un aspetto interessante è che mentre nelle colture coltivate in assenza di citochine sono espansi in maniera significativa i granulociti maturi, nelle colture trattate con le citochine si ha una più marcata espansione di progenitori immaturi, come si può notare osservando la popolazione dei promielociti. Si può notare inoltre che il trattamento che induce la più alta espansione di granulociti maturi è il G-CSF, che sostiene comunque anche un significativo aumento di precursori granulocitari immaturi.

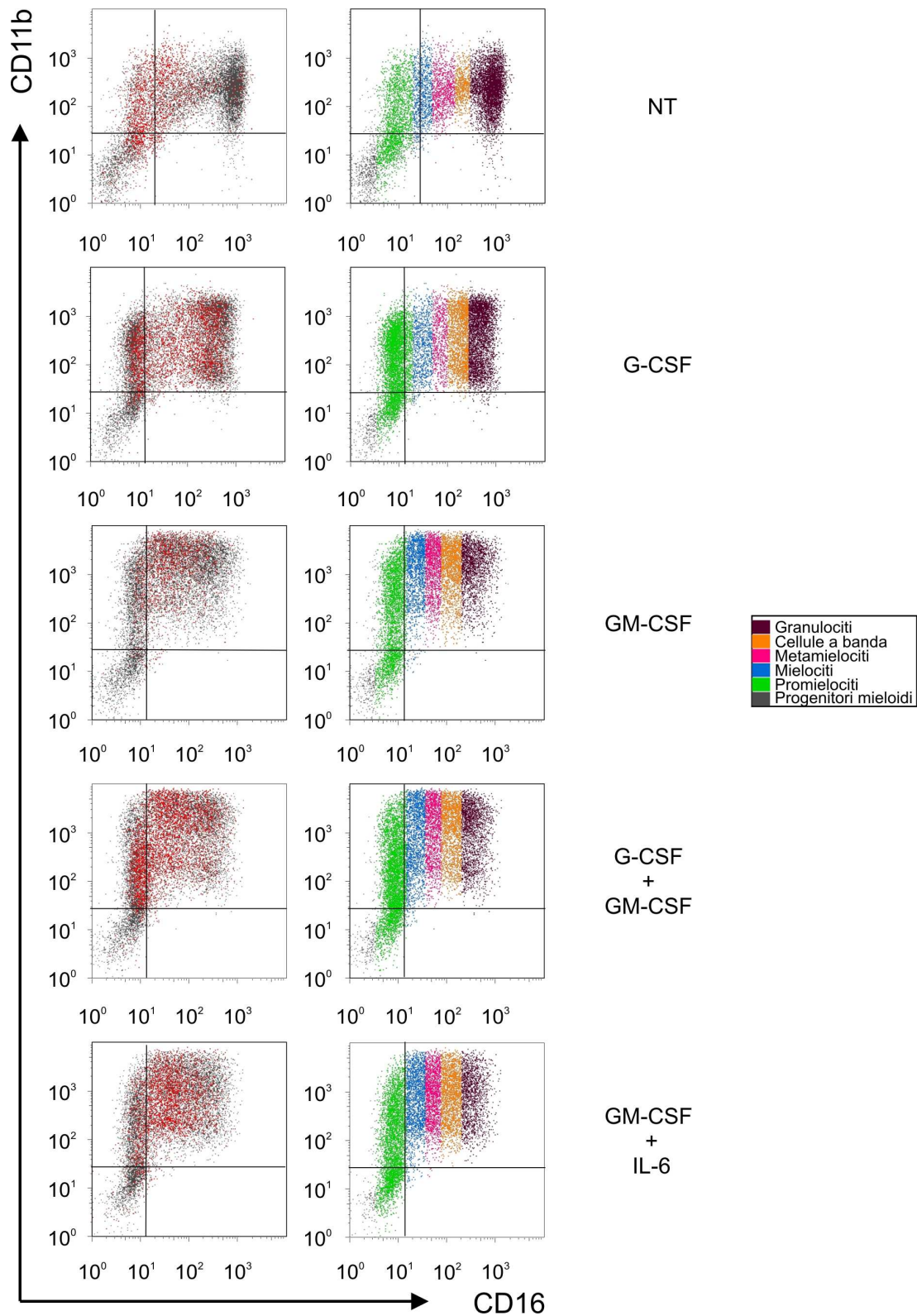


Figura 6
Analisi citofluorimetrica delle cellule di midollo coltivate con diverse combinazioni di fattori di crescita.

I pannelli mostrano l'espressione combinata dei marcatori CD11b e CD16 nelle diverse colture di midollo sottoposte ai diversi trattamenti. In rosso sono indicate le cellule IL4R α ⁺ all'interno delle popolazioni di midollo trattate con le citochine o mantenute *in vitro*, senza l'aggiunta dei fattori di crescita ematopoietici. In base all'espressione del CD16 sul *side scatter* sono state individuate le

diverse popolazioni del differenziamento granulocitario: in verde i *promielociti*, in blu i *mielociti*, in rosa i *metamielociti*, in arancione le *cellule a banda* e in viola i *granulociti maturi*.

Il G-CSF induce una sovra espressione di IL4R α non solo nei precursori mielo-monocitari, ma anche nei granulociti maturi. Per contro, sia questi dati (pannello NT di Figura 6) che i dati ottenuti dal sangue di donatori sani (Figura 2 e Figura 7), indicano invece che l'espressione di questo marcatore normalmente è molto bassa o assente sui granulociti maturi. Questi dati sembrano quindi indicare che G-CSF è una citochina in grado di indurre un aumento dell'espressione di IL4R α anche sulle cellule mature.

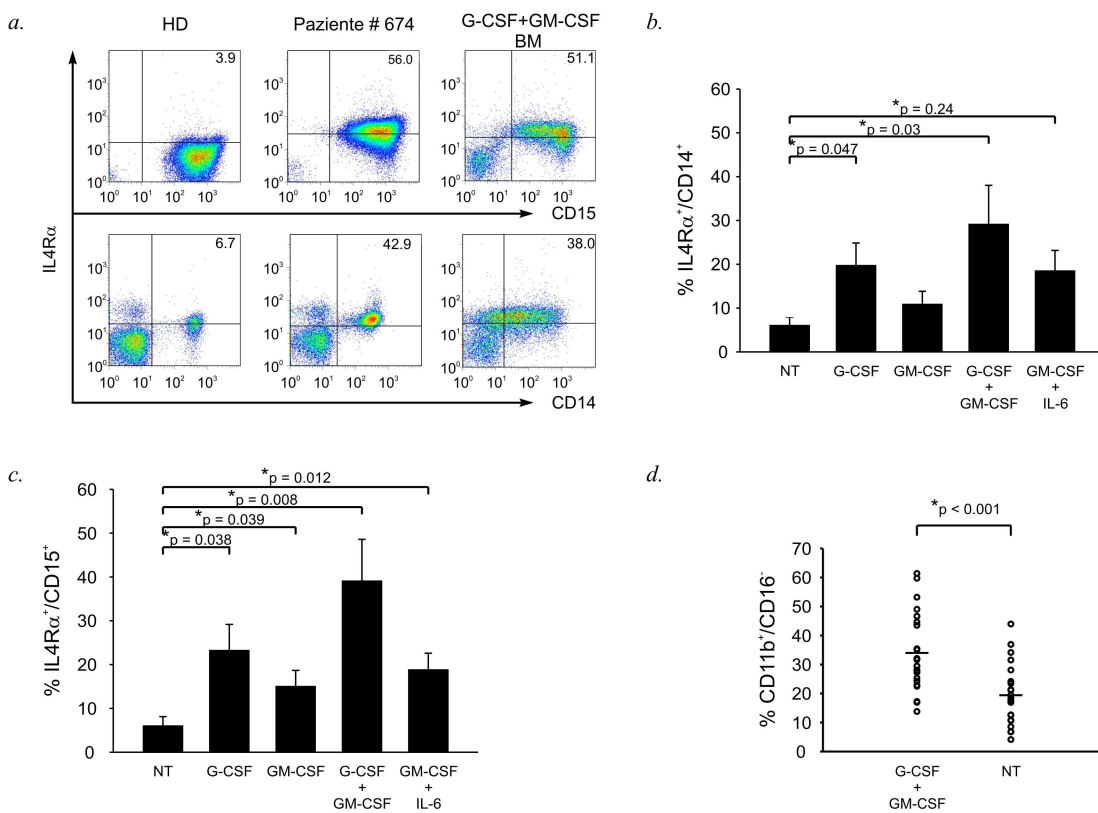


Figura 7
Espansione di cellule mieloidi IL4R α ⁺ in colture di midollo trattate con le citochine.

a. PBMC e PMN di un individuo sano (*HD*), di un paziente con tumore al colon (*paziente # 674*) e cellule di midollo trattate con G-CSF+GM-CSF (*G-CSF+GM-CSF BM*) sono state marcate con CD14, CD15, IL4R α e controllo isotipico. Per calcolare la percentuale di IL4R α tra i monociti, i granulociti o le cellule mieloidi, è stato effettuato un gate morfologico nella regione specifica delle cellule e la percentuale di cellule IL4R α ⁺/CD14⁺ o IL4R α ⁺/CD15⁺ è stata calcolata dopo aver sottratto il segnale del background.

b., c. Le cellule di midollo sono state trattate con G-CSF (n = 6), GM-CSF (n = 6), G-CSF+GM-CSF (n = 6) e GM-CSF+IL-6 (n = 5) per 4 giorni; una parte delle cellule come controllo è stata mantenuta *in vitro* senza l'aggiunta dei fattori di crescita ematopoietici. Al termine del trattamento le cellule sono

state sono state marcate con CD14, CD15, IL4R α e controllo isotipico ed è stata calcolata la percentuale di cellule IL4R α ⁺/CD14⁺ (b.) o IL4R α ⁺/CD15⁺ (c.). I valori della p sono indicati.

d. Le cellule di midollo sono state trattate con G-CSF+GM-CSF e coltivate per 4 giorni, mentre una parte è stata mantenuta *in vitro* nelle stesse condizioni, ma senza citochine. Al termine del trattamento sono state valutate le percentuali di cellule CD11b⁺/CD16⁻. Nella figura sono rappresentati 22 esperimenti indipendenti, nei quali le colture di midollo state allestite parallelamente. Il valore della p è indicato

E' interessante notare che il trattamento delle cellule di midollo con la combinazione delle citochine G-CSF+GM-CSF induce un fenotipo molto simile a quello riscontrato nelle cellule mieloidi isolate da sangue periferico di pazienti con tumore del colon e del melanoma; infatti, il trattamento con queste citochine induce un aumento sia dell'espressione dell'IL4R α , che della percentuale delle cellule CD14⁺ e CD15⁺ che esprimono questo marcatore, in accordo a quanto osservato sui leucociti dei pazienti (Figura 7a.).

Dopo aver dimostrato che il trattamento con G-CSF+GM-CSF induce cellule mieloidi immature che mantengono caratteristiche fenotipiche simili alle MDSC riscontrate nei pazienti affetti da carcinoma del colon e melanoma, abbiamo voluto esplorare l'effetto di un'altra citochina.

Alti livelli di IL-6 sono stati identificati in molti tipi di tumore e sono stati associati ad una cattiva prognosi; inoltre evidenze recenti suggeriscono che IL-6 potrebbe essere rilasciata abbastanza precocemente durante lo sviluppo neoplastico sia dalle cellule trasformate, sia dalle cellule mieloidi infiltranti il tumore (85, 111). Per questi motivi abbiamo deciso di valutare l'efficacia dell'IL-6, trattando le cellule di midollo in modo analogo a quanto descritto prima per gli altri di fattori di crescita.

Abbiamo effettuato delle prove iniziali con varie combinazioni di citochine, associando IL-6 ai fattori di crescita individuati nella prima fase dello studio; la combinazione che ha sostenuto maggiormente la proliferazione cellulare è risultata GM-CSF+IL-6, mentre gli altri trattamenti non hanno permesso di ottenere un numero di cellule sufficienti per effettuare gli esperimenti (dati non mostrati). Per questo motivo abbiamo deciso di utilizzare la combinazione GM-CSF+IL-6 per valutare la sua efficacia in termini di induzione di popolazioni mieloidi con capacità soppressoria.

Le colture di midollo trattate con GM-CSF+IL-6 (Figura 6, ultimo pannello in basso) hanno un fenotipo simile a quello delle cellule di midollo coltivate in presenza di G-CSF+GM-CSF. Infatti il trattamento con queste citochine induce un *pattern* di

maturazione mielo-monocitario molto simile a quello indotto dal trattamento con la combinazione G-CSF+GM-CSF.

L'analisi immunofenotipica delle cellule di midollo trattate con i fattori di crescita è sintetizzata nel pannello *b.* della Figura 7, che raccoglie i dati di esperimenti indipendenti, effettuati su campioni midollari trattati con le diverse combinazioni di fattori di crescita; è possibile osservare che tutte le combinazioni utilizzate, eccetto il GM-CSF, inducono un aumento statisticamente significativo dell'espressione dell'IL4R α sulle cellule CD14⁺ rispetto al controllo non trattato, mentre tutti i trattamenti inducono un aumento significativo dell'IL4R α sulle cellule CD15⁺ (pannello *7c.*). Questi dati sono in accordo a quelli osservati nelle cellule mieloidi separate da pazienti affetti da tumore (Figura 2).

Dal momento che il trattamento con il G-CSF+GM-CSF induce la maggiore espansione della popolazione mieloide IL4R α ⁺, abbiamo deciso di valutare in maggiore dettaglio in diversi esperimenti se ci fossero delle differenze fenotipiche, rispetto alle colture non trattate. Abbiamo confrontato il profilo fenotipico delle cellule di midollo indotto dal trattamento G-CSF+GM-CSF rispetto al controllo privo dell'aggiunta dei fattori di crescita e da questi dati è emerso che il trattamento con la combinazione delle citochine induce un significativo accumulo di progenitori immaturi CD11b⁺CD16⁻, rispetto alle cellule midollari coltivate in assenza dei fattori di crescita ($p < 0.001$), come si può osservare in Figura *7d.*

Per valutare in maggior dettaglio la proliferazione delle cellule di midollo in presenza dei fattori di crescita, abbiamo marcato le cellule di midollo con il CFSE e seguito la proliferazione cellulare al terzo, quarto e quinto giorno di coltura con G-CSF+GM-CSF, effettuando ogni giorno la marcatura con gli anticorpi diretti verso CD11b e CD16 (Figura 8). Per verificare che la marcatura con il CFSE non inducesse tossicità delle cellule mieloidi, abbiamo effettuato l'esperimento in parallelo anche su cellule non marcate con il colorante (parte sinistra della Figura *8a.* e della Figura *8b.*).

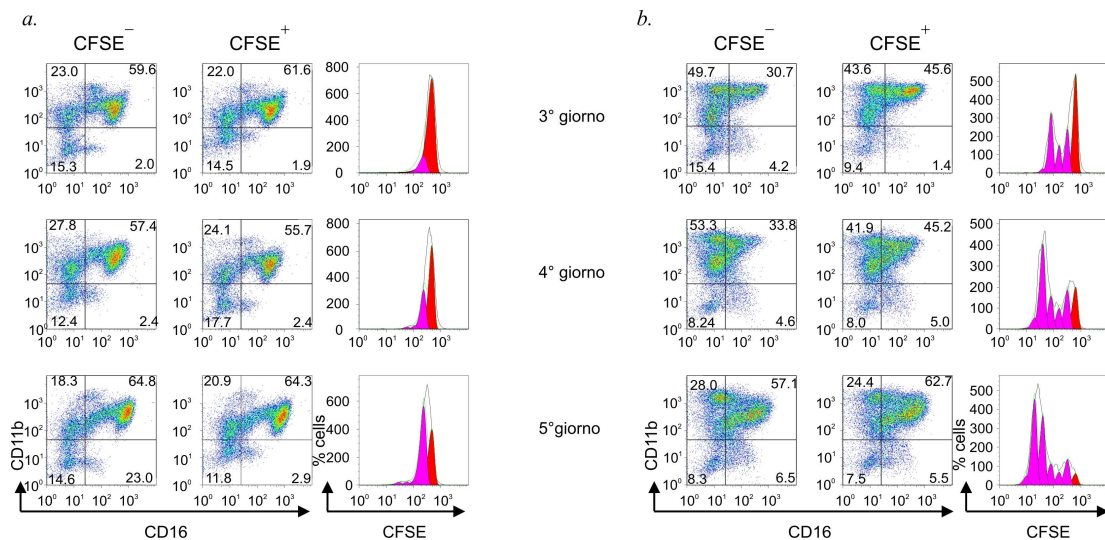


Figura 8
Proliferazione delle cellule di midollo indotta dal trattamento con G-CSF+GM-CSF.

Le cellule di midollo sono state marcate con CFSE e coltivate in presenza di G-CSF+GM-CSF (b.), mentre una parte è stata mantenuta *in vitro* nelle stesse condizioni, ma senza essere sottoposta al trattamento con le citochine (a.). Una parte di cellule sono state coltivate nello stesso modo, ma senza essere marcate con il CFSE (CFSE⁻a., b.). Dopo 3, 4 e 5 giorni di coltura le cellule sono state raccolte e marcate con gli anticorpi CD11b e CD16 ed è stata valutata la proliferazione cellulare, mediante analisi del profilo del segnale del CFSE.

La marcatura con il CFSE non induce cambiamenti nel profilo immunofenotipico cellulare, e non evidenzia alcun tipo di tossicità. Il profilo del CFSE analizzato sulle popolazioni mieloidi ha confermato che il trattamento con G-CSF+GM-CSF induce una notevole proliferazione di queste popolazioni che è già evidente al terzo giorno di coltura e continua nei due giorni successivi; invece le colture di midollo di controllo non trattate mostrano solamente una modesta proliferazione tra il quarto ed il quinto giorno di coltura.

2.2.2 Attività soppressoria delle BM-MDSC nei confronti di linfociti attivati da alloantigeni e da mitogeni

Il trattamento con le combinazioni G-CSF+GM-CSF e GM-CSF+IL-6 induce popolazioni mieloidi immature che esprimono IL4R α , un fenotipo tipico delle MDSC e pertanto abbiamo indagato se queste popolazioni possedessero anche attività immunosoppressoria. In altre parole abbiamo verificato che il trattamento *in*

in vitro inducesse non solo il fenotipo, ma anche la caratteristica funzionale più importante delle MDSC.

Abbiamo quindi valutato la capacità delle cellule di midollo dopo trattamento *in vitro* di sopprimere la proliferazione di linfociti attivati dall'alloantigene. A questo scopo abbiamo allestito una MLR in cui PBMC *responder* sono stati stimolati per 7 giorni con un pool di PBMC *stimulator* a cui sono state aggiunte come terza parte, in diluizione, le colture di midollo sottoposte ai diversi trattamenti citochinici e irradiate. La valutazione della proliferazione, quantificata mediante incorporazione di timidina triziata, è stata effettuata ponendo uguale a 100 la proliferazione dei linfociti in assenza delle colture di midollo. Le colture trattate con il GM-CSF e con la combinazione di G-CSF+GM-CSF sono in grado di sopprimere significativamente ed in modo dose-dipendente la proliferazione dei PBMC allogenicici rispetto al controllo privo dell'aggiunta delle colture di midollo ($p = 0.048$ e $p = 0.022$); al contrario le colture non trattate e quelle trattate solo con il G-CSF non sono in grado di ridurre in modo statisticamente significativo la proliferazione linfocitaria (Figura 9a.).

Anche le colture di BM trattate con GM-CSF+IL-6 sono in grado di sopprimere la proliferazione linfocitaria analogamente a quanto osservato per i BM trattati con G-CSF+GM-CSF (Figura 9a.).

Successivamente abbiamo valutato la soppressione indotta dalle BM-MDSC ottenute con G-CSF+GM-CSF mettendo a confronto il saggio della timidina triziata (Figura 9b.) con quello effettuato utilizzando il CFSE (Figura 9c.). In tutti gli esperimenti riportati l'aggiunta delle BM-MDSC induce una notevole soppressione della proliferazione che si evidenzia nel saggio con CFSE come un accumulo delle cellule nella prima generazione e con una conseguente diminuzione delle cellule nelle generazioni successivi del ciclo cellulare. La soppressione valutata nel saggio con CFSE è paragonabile a quella calcolata mediante incorporazione di timidina triziata (Figura 9b.). Dal momento che i due saggi danno risultati paragonabili, entrambi possono essere utilizzati per individuare e caratterizzare la soppressione indotta dalle cellule di midollo trattate con le citochine.

Poiché le cellule di midollo trattate con le citochine presentano sia il fenotipo (Figura 7) che l'attività soppressoria (Figura 9) caratteristica delle MDSC, possiamo definirle come cellule mieloidi soppressorie di derivazione midollare (BM-MDSC).

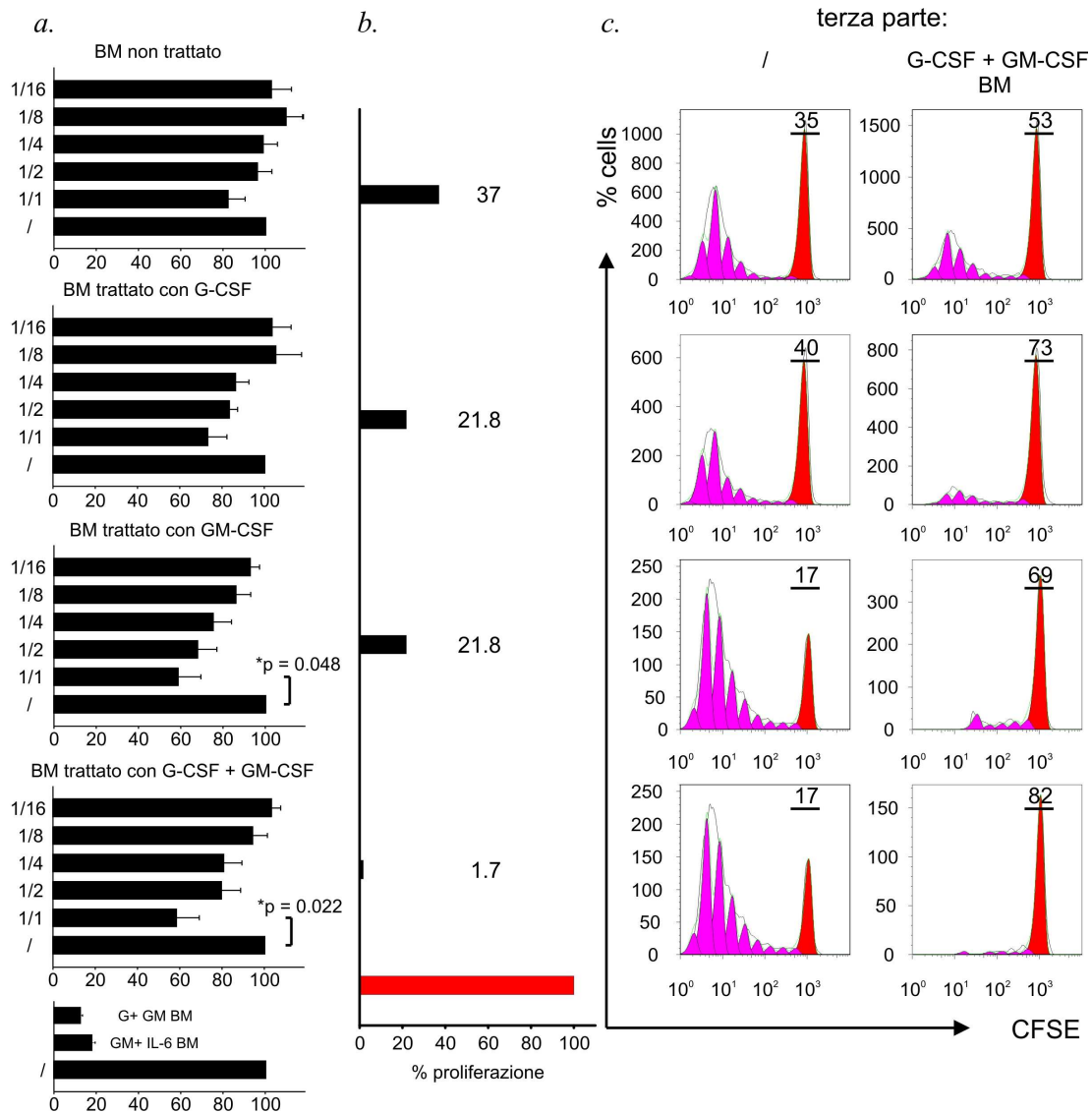


Figura 9
Cellule di midollo trattate *in vitro* con citochine sopprimono la proliferazione di PBMC attivati da alloantigene.

a. MLR allogeniche sono state allestite stimolando PBMC da individui sani con un pool di PBMC irradiati isolati da 3 donatori sani in rapporto 1:1 per 7 giorni; le cellule di midollo sottoposte ai trattamenti con le diverse combinazioni di citochine (*NT*, *G-CSF*, *GM-CSF*, *G-CSF+GM-CSF* e *GM-CSF+IL-6*) sono state irradiate ed aggiunte come terza parte in diluizione. La proliferazione è stata valutata mediante incorporazione di timidina triziata al settimo giorno. Il controllo di proliferazione rappresentato dai PBMC responder stimolati in presenza dei PBMC stimulator, ma senza le cellule di midollo è stato posto uguale a 100 e tutti gli altri valori sono stati calcolati come percentuale rispetto a questo valore. La figura rappresenta la media di 3 esperimenti indipendenti \pm SE per i trattamenti NT, G-CSF, GM-CSF, G-CSF+GM-CSF, mentre la media di 2 esperimenti per GM-CSF+IL-6. I valori della p sono indicati.

b., *c.* PBMC responder sono stati marcati con CFSE e stimolati con un pool di PBMC stimulator irradiati per 7 giorni; le colture di midollo, dopo trattamento con i fattori di crescita, sono state aggiunte come terza parte. La proliferazione linfocitaria è stata valutata in due diversi modi, che sono stati messi a confronto: in *c.* è rappresentato il profilo del CFSE delle diverse popolazioni prese in considerazione, dopo marcatura con il CD3-APC, lettura citofluorimetrica ed analisi. In *b.* è invece raffigurata la percentuale di proliferazione dei linfociti, in presenza delle cellule di midollo trattate, valutata mediante incorporazione di timidina triziata.

Un aspetto interessante che è emerso nei diversi esperimenti di MLR effettuati, è che il livello di attivazione dei linfociti correla con l'induzione dell'attività immunosoppressoria da parte delle BM-MDSC (dati non mostrati). Abbiamo infatti osservato che in alcuni esperimenti, caratterizzati da una bassa proliferazione linfocitaria, le BM-MDSC non erano in grado di sopprimere la proliferazione dei linfociti. Per contro, in tutti gli esperimenti in cui era presente un'elevata attivazione dei linfociti, l'aggiunta delle BM-MDSC induceva una significativa soppressione della risposta linfocitaria. Queste osservazioni suggeriscono che il livello di attivazione dei linfociti sia fondamentale per l'attuazione del programma di soppressione mediato dalle BM-MDSC, e che queste cellule non siano in grado di interferire con la proliferazione di linfociti caratterizzati da una bassa proliferazione.

La soppressione mediata dalle BM-MDSC è stata quindi valutata anche in un modello di attivazione indipendente dall'antigene, stimolando PBMC responder CFSE⁺ con l'anticorpo anti-CD3 e analizzando l'effetto dell'aggiunta delle BM-MDSC sulla riduzione del ciclo cellulare dopo 4 giorni di coltura. Nella figura 10 sono riportati 3 esperimenti condotti parallelamente in 3 diversi campioni di midollo trattati con le diverse combinazioni di citochine e aggiunti in rapporto 1:1 alle colture. Le colture non trattate e quelle trattate con il G-CSF inducono un modesto rallentamento della proliferazione linfocitaria rispetto ai PBMC stimolati in assenza delle colture midollari; per contro una soppressione più evidente si verifica in presenza di colture di midollo trattate con GM-CSF e con G-CSF+GM-CSF.

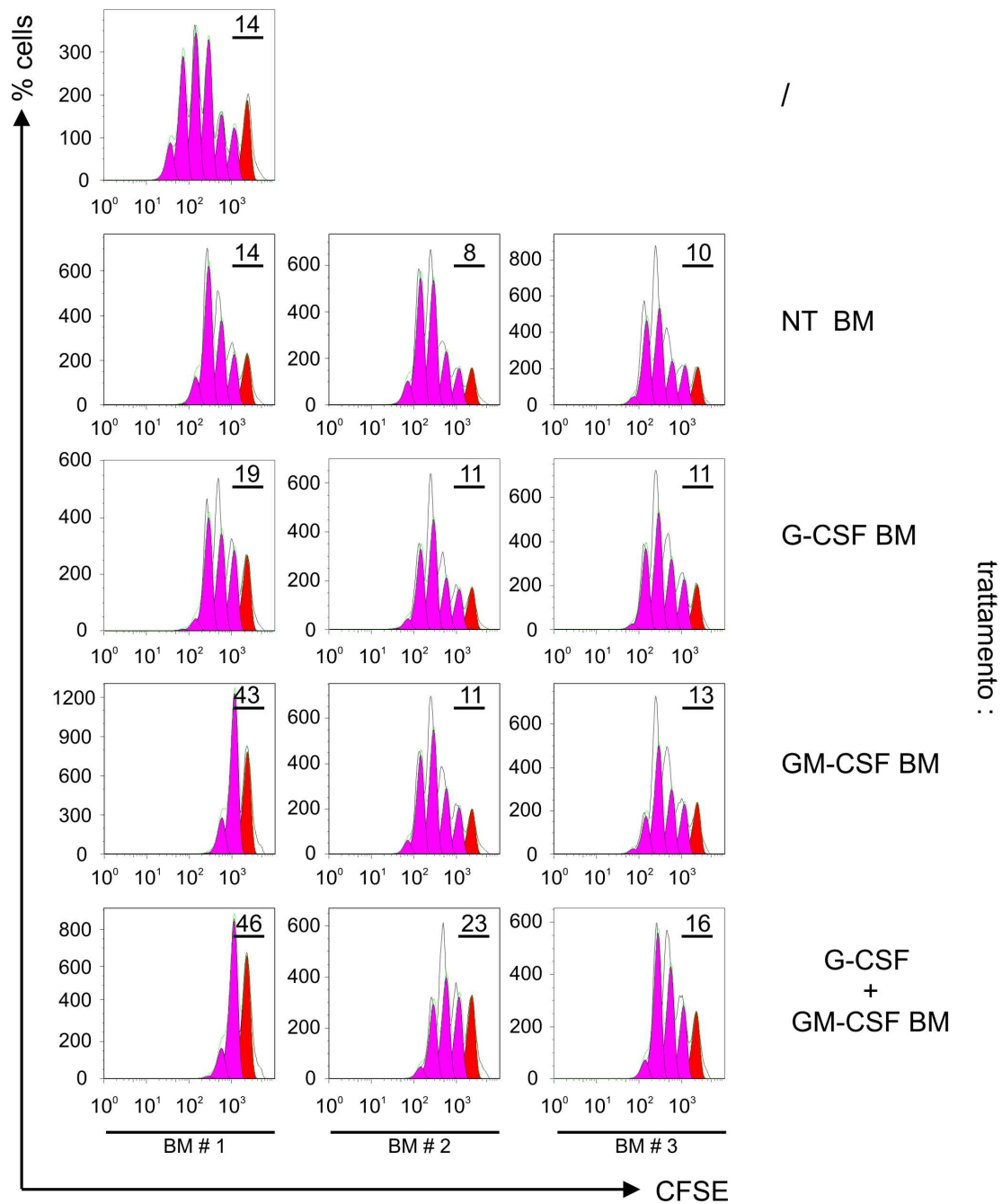


Figura 10

Cellule di midollo trattate *in vitro* con le citochine sopprimono la proliferazione di PBMC attivati da anti-CD3.

PBMC marcati con il CFSE sono stati stimolati con l'anticorpo anti-CD3 per 4 giorni, in presenza di cellule di midollo non trattate o trattate con le diverse combinazioni di fattori di crescita. Le cellule, al termine della coltura, sono state marcate con l'anticorpo anti-CD3, per analizzare il numero dei cicli cellulari. Nella figura sono rappresentati 3 esperimenti indipendenti condotti parallelamente su tre diversi campioni di midolli.

Successivamente abbiamo deciso di attivare i linfociti con l'anticorpo anti-CD3, aggiungendo anche un anticorpo anti-CD28 che potenzia il segnale di attivazione inviato attraverso il complesso recettoriale CD3/TcR α/β .

Nella Figura 11a. è rappresentata la media delle proliferazioni linfocitarie in 3 diversi esperimenti in cui abbiamo stimolato i PBMC responder solo con l'anti-CD3 (barra nera) oppure con la combinazione di anti-CD3 e anti-CD28 (barra grigio scuro) ed in presenza delle BM-MDSC; l'aggiunta dell'anti-CD28 induce un aumento significativo della riduzione della proliferazione linfocitaria da parte delle colture midollari ($p = 0.018$). Per questo motivo è stato scelto per tutti gli esperimenti successivi di stimolare i PBMC con anti-CD3 e anti-CD28.

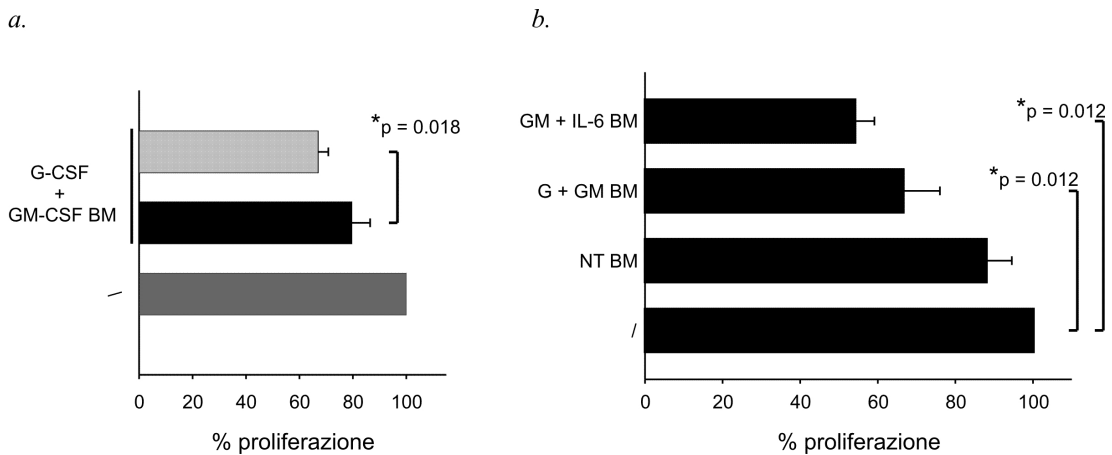


Figura 11
La soppressione di PBMC attivati con anti-CD3 e anti-CD28, in presenza di BM-MDSC.

a. I PBMC, dopo marcatura con il CFSE, sono stati attivati con l'anticorpo anti-CD3 (barra nera), oppure con l'anti-CD3 e l'anti-CD28 (barra grigio chiaro) aggiunto alla coltura. Dopo 4 giorni è stato quindi valutato l'effetto dell'aggiunta delle cellule di midollo trattate con G-CSF+GM-CSF sulla proliferazione linfocitaria, marcando le cellule con l'anticorpo anti-CD3. La quantificazione della proliferazione è stata effettuata analizzando il numero delle cellule proliferanti dalla generazione 3 a 10 nel controllo di proliferazione senza aggiunta di BM-MDSC e assumendo tale valore uguale a 100. Nella figura è rappresentata la media \pm SE di tre esperimenti indipendenti condotti su tre diversi campioni di midollo. Il valore della p è indicato nell'immagine.

b. PBMC CFSE⁺ sono stati stimolati con anti-CD3 e anti-CD28 per 4 giorni e coltivati in presenza delle cellule di midollo non trattate ($n = 7$) o trattate con le combinazioni di fattori di crescita G-CSF+GM-CSF ($n = 7$) e GM-CSF+IL-6 ($n = 3$). Dopo marcatura delle cellule con l'anticorpo anti-CD3, è stata valutata la proliferazione cellulare, mediante valutazione dei picchi di divisione. La quantificazione della proliferazione è stata effettuata analizzando il numero delle cellule proliferanti dalla generazione 3 a 10 nel controllo di proliferazione senza aggiunta di BM-MDSC e assumendo tale valore uguale a 100. Il valore della p è indicato.

Successivamente abbiamo verificato l'attività soppressoria delle BM-MDSC ottenute con GM-CSF+IL-6 anche sui linfociti attivati con la combinazione anti-

CD3/CD28. Nella Figura 11*b*. è rappresentata la media della percentuale della proliferazione di PBMC CFSE⁺, stimolati con anti-CD3/CD28, in presenza di cellule di midollo trattate con G-CSF+GM-CSF, GM-CSF+IL-6 oppure senza trattamento con i fattori di crescita. La percentuale della proliferazione è stata valutata considerando gli eventi dalla seconda generazione alla settima e ponendo tale valore del controllo senza aggiunta delle cellule di midollo uguale a 100. Entrambi i trattamenti con i fattori di crescita inducono una riduzione statisticamente significativa della proliferazione dei linfociti stimolati con mitogeni, rispetto al controllo privo dell'aggiunta delle cellule di midollo, mentre le colture non trattate non sono in grado di interferire in maniera significativa con la proliferazione dei linfociti.

3. Definizione dei meccanismi molecolari coinvolti nell'immunosoppressione indotta dalle BM-MDSC

3.1 La soppressione mediata dalla BM-MDSC richiede il contatto cellula-cellula

Per verificare se le BM-MDSC sopprimono la risposta linfocitaria mediante il contatto cellulare, abbiamo allestito una coltura in cui i PBMC *responder* CFSE⁺ stimolati con anti-CD3/CD28, sono stati separati dalle BM-MDSC mediante un inserto; l'inserto, pur separando le BM-MDSC dai *responder*, tuttavia garantisce il flusso di metaboliti tra le due componenti cellulari, per cui se la funzione immunomodulante delle BM-MDSC dipendesse esclusivamente dal rilascio di sostanze immunosoppressive, la separazione fisica non ostacolerebbe l'attivazione del programma soppressorio. Come è possibile osservare dalla Figura 12, solamente se le BM-MDSC sono in contatto diretto con i linfociti attivati, si verifica la soppressione della proliferazione cellulare, mentre l'aggiunta delle cellule soppressive sopra l'inserto non altera minimamente la proliferazione dei linfociti.

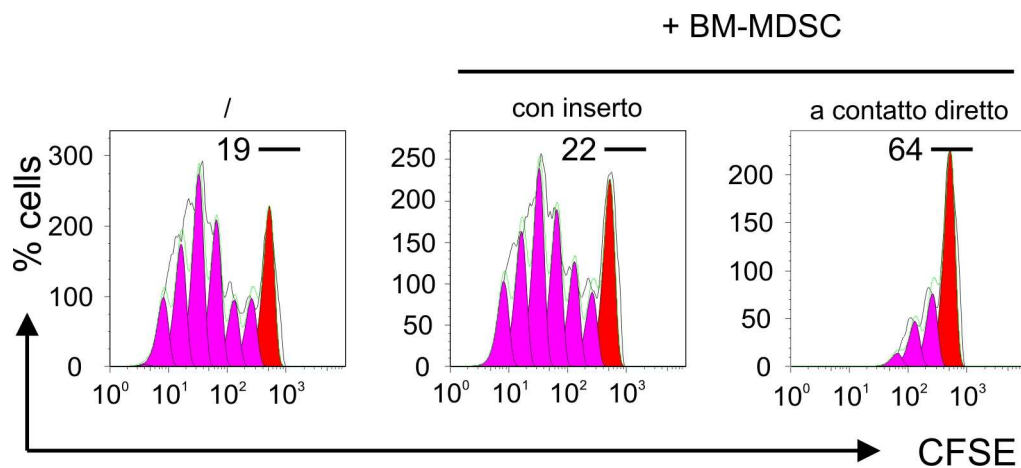


Figura 12
Il contatto cellula-cellula è richiesto per la soppressione indotta dalle BM-MDSC.

PBMC marcati con il CFSE sono stati stimolati con anti-CD3 e anti-CD28 per 4 giorni (sinistra); le BM-MDSC sono state aggiunte a contatto diretto con i *responder* (destra) o sono state separate mediante un inserto di 0.4 μm (centro). Le cellule al termine della stimolazione sono state raccolte e marcate con l'anti-CD3 e le cellule CFSE⁺ sono state analizzate nel *gate* CD3⁺, per valutare la proliferazione cellulare.

Questi dati quindi indicano che la funzione soppressoria delle BM-MDSC necessita del contatto con i linfociti.

3.2 BM-MDSC diminuiscono l'espressione della catena ζ del CD3 dei linfociti

Numerosi studi hanno dimostrato che un evento che si associa all'immunosoppressione è la diminuzione dell'espressione della catena ζ del CD3 dei linfociti (77). Per questo motivo abbiamo voluto verificare se anche l'immunosoppressione mediata dalle BM-MDSC fosse accompagnata da questo evento.

A tale scopo abbiamo attivato PBMC con anti-CD3/CD28, in presenza delle cellule di midollo isolate *ex-vivo*, delle cellule di midollo mantenute *in vitro* senza l'aggiunta dei fattori di crescita oppure delle BM-MDSC maturate con G-CSF+GM-CSF. Il quarto giorno di stimolazione, le cellule sono state marcate con gli anticorpi diretti contro la catena CD3 ϵ di superficie, il CD8 e la catena CD3 ζ intracitoplasmatica. L'analisi è stata effettuata sulle cellule CFSE⁺ analizzando il segnale del CD3 ζ nel *gate* costituito dalle cellule CD3 ϵ ⁺/CD8⁺.

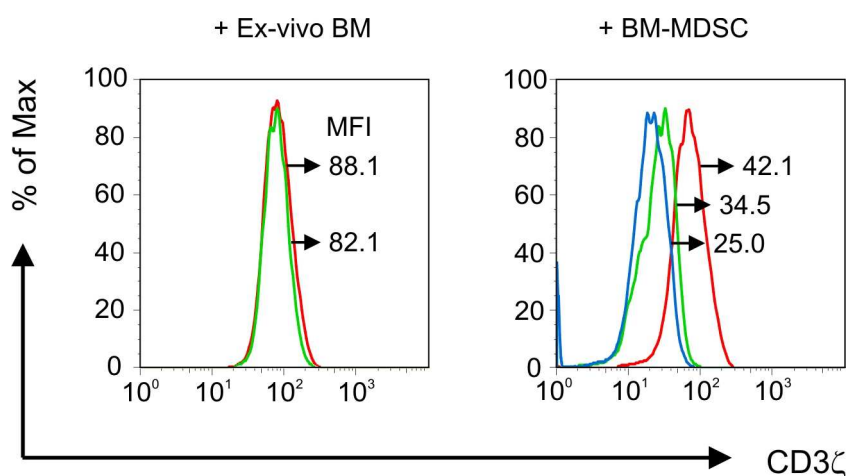


Figura 13
Diminuzione della catena ζ del CD3 di PBMC attivati, in presenza di BM-MDSC.

Analisi a quattro colori dell'espressione del CD3 ζ di PBMC stimolati con i mitogeni, in presenza delle cellule di midollo prima del trattamento (in verde nel grafico di sinistra) o di cellule di BM-MDSC (in blu nel grafico di destra) o mantenute *in vitro*, senza l'aggiunta dei fattori ematopoietici (in verde nel grafico di destra). Il controllo è rappresentato sia nel grafico di sinistra, che nel grafico di destra dalle curve rosse, che si riferiscono ai PBMC stimolati, senza l'aggiunta delle cellule di midollo. La MFI di CD3 ζ è stata calcolata nel *gate* CFSE⁺/CD3 ϵ ⁺/CD8⁺.

In Figura 13 è mostrato un esempio rappresentativo dell'espressione intracitoplasmatica della proteina CD3 ζ . Le cellule di midollo isolate *ex-vivo* (curva

verde nel grafico di sinistra) o mantenute in coltura per 4 giorni senza l'aggiunta di citochine (curva verde nel grafico di destra) non sono in grado di interferire con l'espressione della proteina. Solamente l'aggiunta delle BM-MDSC (curva blu) induce una diminuzione della MFI della proteina CD3 ζ in maniera significativa (da 42.1 a 25.0). Questi risultati indicano che le BM-MDSC esercitano il loro meccanismo di soppressione sui linfociti attraverso la riduzione dell'espressione della catena ζ del complesso recettoriale CD3, come già riportato in letteratura per le MDSC.

3.3 C-EBP β è indispensabile per il programma di immunosoppressione

Il G-CSF e il GM-CSF regolano la granulopoiesi di emergenza attraverso l'induzione di C/EBP β , un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia C/EBP, che ha un ruolo importante nella regolazione della crescita e nella differenziazione delle cellule mieloidi e linfoidi (112)

Abbiamo quindi indagato il ruolo del C/EBP β nella differenziazione e nell'induzione della soppressione mediata dalle BM-MDSC. A tale scopo abbiamo valutato l'impatto funzionale della diminuzione dell'espressione del fattore di trascrizione sul programma immunosoppressivo delle BM-MDSC, effettuando il *knockdown* della proteina, mediante infezione con vettori lentivirali, in colture di midollo in cui abbiamo indotto la differenziazione a MDSC con le citochine G-CSF+GM-CSF.

Dopo 24 ore di coltura con G-CSF+GM-CSF, abbiamo espresso uno shRNA contro C/EBP β durante il differenziamento delle BM-MDSC. Dopo 4 giorni di coltura abbiamo valutato la diminuzione del fattore trascrizionale mediante RT-PCR e Western blot ed abbiamo osservato una riduzione del 35% del messaggero e del 45% della proteina. Per contro, l'infezione con sh RNA di controllo non altera i livelli di C/EBP β . In Western blot si possono osservare le tre isoforme di C/EBP β (LAP*, LAP, LIP) e tutte e 3 sono ridotte in seguito ad infezione (Figura 14a.).

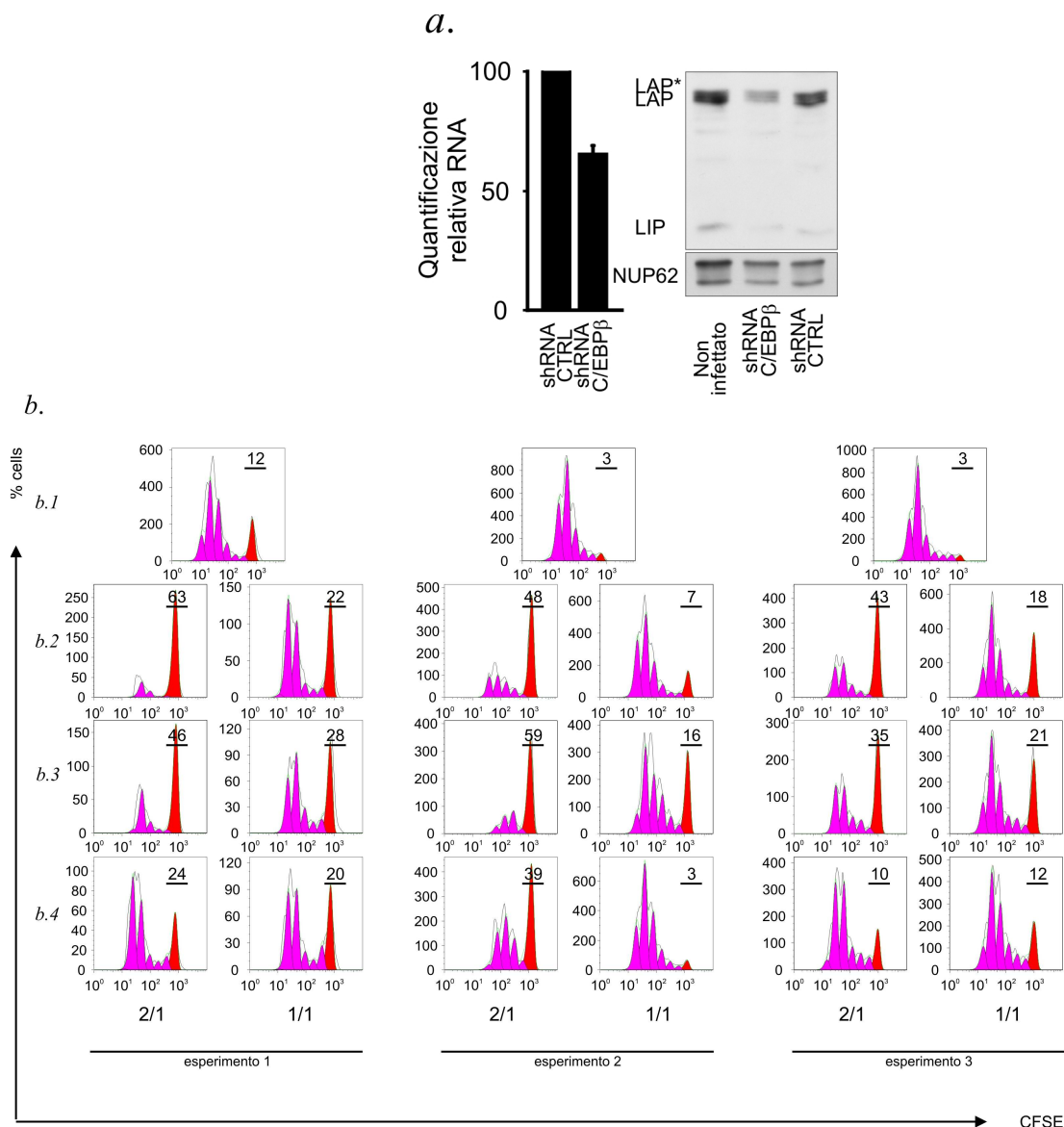


Figura 14

La diminuzione di C/EBPβ nelle BM-MDSC permette di recuperare la proliferazione linfocitaria.

a. Le BM-MDSC durante il differenziamento con i fattori di crescita G-CSG+GM-CSF sono state trasfettate con vettori lentivirali codificanti per un shRNA specifico per C/EBPβ e per un shRNA di controllo. Al quarto giorno di coltura, le cellule sono state raccolte e analizzate per l'espressione del messaggero e della proteina, mediante RT-PCR e Western blot. Nel pannello sinistro è rappresentata la media \pm SE di 3 esperimenti indipendenti, nei quali è stato valutato mediante RT-PCR quantitativa l'RNA nelle colture trasfettate con l'shRNA per C/EBPβ, rispetto al shRNA di controllo. Nel pannello destro invece è riportato un esempio rappresentativo della riduzione dei livelli proteici delle tre isoforme (*LAP**, *LAP* e *LIP*) di C/EBPβ dopo trasfezione con il vettore lentivirale specifico (colonna centrale), rispetto alle BM-MDSC non infettate (colonna sinistra) o infettate con il vettore non specifico (colonna destra).

b. Le BM-MDSC sono state trasfettate con il vettore lentivirale per C/EBPβ e con il vettore di controllo dopo 1 giorno di trattamento con le citochine; al termine del differenziamento sono state allestite delle colture, in cui PBMC sono stati attivati con anti-CD3 e anti-CD28 (*b.1*), in presenza delle cellule non trasfettate (*b.2*), delle cellule trasfettate con il vettore di controllo (*b.3*) e delle cellule con C/EBPβ silenziato (*b.4*). Nella figura sono rappresentati 3 esperimenti, in cui le cellule di midollo sono state aggiunte in rapporto 2:1 o 1:1, rispetto ai PBMC responder.

Abbiamo quindi valutato funzionalmente l'impatto della riduzione di C/EBP β nelle BM-MDSC. In Figura 14b sono raffigurati tre esperimenti indipendenti, in cui è stata misurata la proliferazione di PBMC attivati con anti-CD3/CD28 (b.1). L'aggiunta in coltura delle BM-MDSC (b.2) induce, come atteso, una diminuzione della proliferazione linfocitaria; allo stesso modo, le BM-MDSC infettate con l'shRNA di controllo (b.3) non alterano significativamente la proliferazione rispetto alle BM-MDSC non infettate. In presenza, invece, delle BM-MDSC con C/EBP β silenziato (b.4) la soppressione della proliferazione dei linfociti attivati viene recuperata, come si può dedurre osservando il numero di eventi nella prima generazione. Questo effetto è maggiore quando le BM-MDSC sono aggiunte in rapporto 2:1 rispetto ai PBMC *responder*, ma risulta comunque ancora significativo se si considera il rapporto 1:1.

Dai tali dati emerge quindi come il fattore di trascrizione C/EBP β rivesta un ruolo centrale nell'induzione della funzione inibitoria esercitata dalle BM-MDSC, poiché anche una riduzione parziale della proteina riduce in modo quasi completo il programma soppressorio esercitato dalle BM-MDSC.

3.4 IL-4 e IL-13 sono richiesti per la soppressione.

Abbiamo dimostrato che il trattamento con G-CSF+GM-CSF induce *in vitro* BM-MDSC con caratteristiche fenotipiche e funzionali simili a quelle riscontrate in pazienti con tumore; una delle caratteristiche fondamentali del trattamento con i fattori di crescita ematopoietici è la regolazione dell'espressione della catena α del recettore dell'interleuchina 4, che normalmente non è espresso dalle cellule mieloidi mature. Per questi motivi abbiamo indagato se l'aggiunta *in vitro* di una proteina in grado di legare sia l'interleuchina 4, che l'interleuchina 13 (gentilmente fornito da Amgen), potesse bloccare l'attività inibitoria esercitata dalle BM-MDSC nei confronti dei linfociti. Questa sostanza, già in uso per patologie asmatiche, è una molecola contro l'IL4-R umano, dotato di un frammento Fc che ha funzione di stabilizzazione ed è in grado di bloccare sia IL-4 che IL-13.

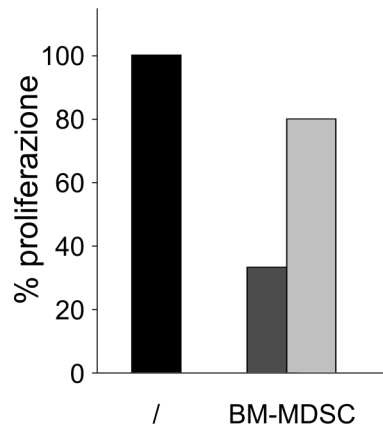


Figura 15
Un inibitore di IL-4 e IL-13 induce il recupero della proliferazione linfocitaria, inibita dalle BM-MDSC.

Effetto dell'aggiunta di un inibitore di IL-14 e IL-13 in una coltura di PBMC attivati con anti-CD3/CD28 e coltivati per 4 giorni in presenza delle BM-MDSC. Al quarto giorno di stimolazione, le cellule sono state marcate con anti-CD3 ed è stata quantificata nel *gate* morfologico la percentuale delle cellule CFSE⁺/CD3⁺ nel controllo dei PBMC stimolati in assenza delle BM-MDSC (barra nera), nelle colture con i PBMC stimolati in presenza delle BM-MDSC (barra grigio scuro) e con l'aggiunta dell'inibitore (barra grigio chiaro). Per quantificare la proliferazione, la percentuale della cellule CFSE⁺/CD3⁺ del controllo è stata posta uguale a 100 e rispetto a questo valore è stata calcolata la proliferazione in presenza delle BM-MDSC e dell'inibitore. La figura mostra un esperimento rappresentativo di 3.

La Figura 15 mostra un esperimento rappresentativo in cui è stato aggiunto l'inibitore nelle colture di PBMC stimolati con anti-CD3/CD28, in presenza delle BM-MDSC; l'inibitore induce un recupero quasi completo della proliferazione, rispetto al controllo privo dell'aggiunta della molecola. Questi dati preliminari, che dovranno essere verificati in ulteriori esperimenti, suggeriscono quindi che anche le BM-MDSC necessitano di IL4R α per esercitare la loro attività soppressoria e aprono la strada a tutta una serie di ipotesi di lavoro che stiamo attualmente testando.

4. Definizione delle sottopopolazioni delle BM-MDSC responsabili della immunosoppressione.

4.1 Separazione delle BM-MDSC in sottopopolazioni *lineage* positiva e negativa e analisi della soppressione indotta.

Nella parte finale del mio progetto mi sono occupata di definire la sottopopolazione cellulare responsabile dell'immunosoppressione delle BM-MDSC. Tale obiettivo è stato dettato da due tipi di constatazioni; in primo luogo le colture di BM che otteniamo con le citochine non sono omogenee, ma contengono sia precursori immaturi che cellule mieloidi mature e con proporzioni variabili nei vari esperimenti, in secondo luogo abbiamo osservato che la soppressione nei diversi esperimenti condotti può essere esercitata in modo variabile. Abbiamo pertanto ipotizzato che i precursori midollari su cui agiscono le citochine possano essere presenti in percentuali variabili nei diversi midolli e che questa eterogeneità di partenza possa dar luogo a colture in cui le BM-MDSC sono presenti in percentuali variabili. I nostri dati precedenti dimostrano che il trattamento con i fattori di crescita determina un aumento delle popolazioni più immature $CD11b^+/CD16^-$ che corrispondono a promielociti e progenitori mieloidi (Figura 6 e 7) ; inoltre dati di letteratura indicano che la frazione *Lineage* negativa costituisce la frazione immatura soppressoria anche nel sangue periferico di pazienti affetti da tumore. Per questi motivi abbiamo deciso di separare le BM-MDSC nelle due frazioni *Lineage* negativa e positiva mediante separazione immunomagnetica e di verificare se queste sono responsabili parzialmente o completamente della soppressione indotta dalle BM-MDSC.

Dopo aver indotto BM-MDSC con G-CSF+GM-CSF, le colture sono state sottoposte a separazione immunomagnetica con il cocktail *Lineage* contenente gli anticorpi anti-CD14, CD15, CD16, CD56, CD11b, CD3, CD19 e glicoforina. Le separazioni ci hanno consentito di ottenere le frazioni *Lineage* positiva (Lin^+) contenente tutte le cellule ematopoietiche mature, come i linfociti T, i linfociti B, le cellule NK, i granulociti, i monociti, le cellule dendritiche e gli eritrociti e la frazione *Lineage* negativa (Lin^-) contenente invece le cellule staminali e i progenitori mieloidi più immaturi. Abbiamo osservato la morfologia delle frazioni separate da BM-MDSC nei citospin colorati con il May-Grunwald-Giemsa (Figura 16a.). Si può

chiaramente osservare che mentre la frazione non separata e quella Lin^+ sono caratterizzate da un'estesa eterogeneità cellulare e dalla presenza di cellule mature multilobate, la frazione Lin^- è priva di cellule mature ed ha un notevole arricchimento di popolazioni mieloidi immature. Tuttavia la sola osservazione morfologica non permette di determinare in maniera certa lo stadio di differenziazione delle cellule mieloidi.

Nella Figura 16b. la marcatura con gli anticorpi diretti contro CD11b e CD16 ci ha consentito di valutare che la separazione immunomagnetica porta alla completa eliminazione dei linfociti nella frazione Lin^- , dal momento che non è più visibile la popolazione $CD11b^-/CD16^-$, che invece è presente nella frazione Lin^+ . Inoltre nella frazione Lin^- abbiamo osservato un notevole arricchimento della popolazione $CD11b^+/CD16^-$, corrispondente ai promielociti. Infine la frazione Lin^- , è costituita da cellule esprimenti $CD11b^{dim}$ a differenza delle BM-MDSC o della frazione Lin^+ , in cui invece sono presenti cellule $CD11b^{high}$. Un aspetto interessante è che nella frazione Lin^- mancano completamente le popolazioni mature, come i granulociti e i monociti, caratterizzate rispettivamente dall'alta espressione dei marcatori CD16 e CD11b; inoltre anche i precursori granulocitari con espressione intermedia del CD16 sono completamente depletati nella frazione Lin^- . Al contrario nella frazione Lin^+ sono presenti tutti gli stadi di differenziazione delle linea granulocitaria.

Per testare funzionalmente le frazioni separate, PBMC *responder* CFSE⁺ sono stati attivati con anti-CD3 e anti-CD28 e coltivati per 4 giorni, in presenza delle frazioni Lin^+ , Lin^- o con BM-MDSC non separate; la proliferazione linfocitaria è stata valutata quantificando le cellule CFSE⁺/CD3⁺ nel *gate* morfologico dei PBMC stimolati in assenza delle BM-MDSC, ponendo tale valore uguale a 100, e rapportando in percentuale la proliferazione delle colture contenenti le cellule mieloidi.

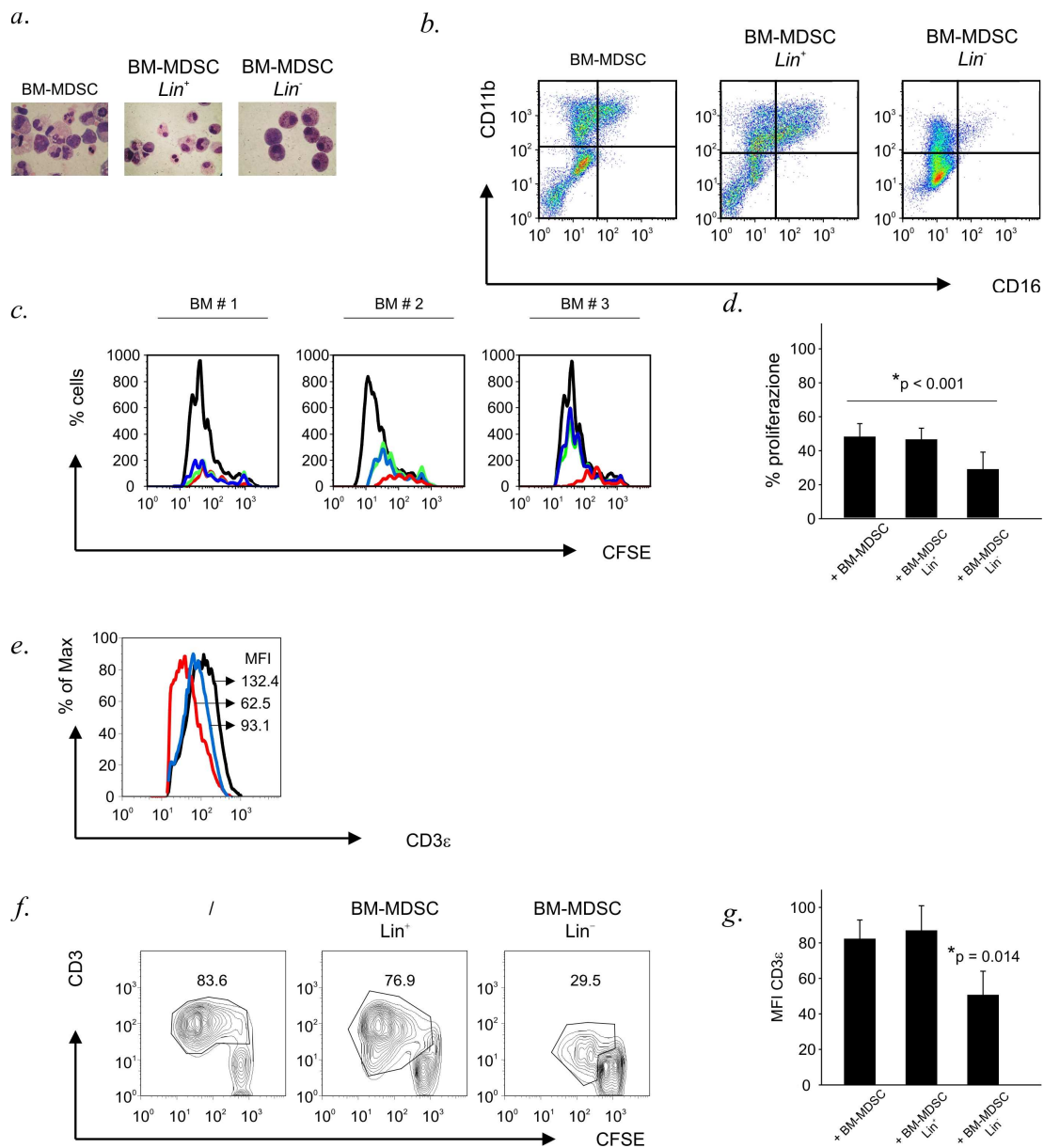


Figura 16
Suppressione della proliferazione linfocitaria indotta dalle frazioni *Lineage* negativa e positiva delle BM-MDSC.

a. Citospin colorati con May-Grunwald-Giemsa delle BM-MDSC e delle frazioni BM-MDSC *Lin*⁺ e BM-MDSC *Lin*⁻.

b. Analisi citofluorimetrica mediante marcatura con gli anticorpo anti-CD11b e anti-CD16 delle BM-MDSC e delle frazioni BM-MDSC *Lin*⁺ e BM-MDSC *Lin*⁻.

c., *d.* BM-MDSC indotte con G-CSF+GM-CSF sono state separate immunomagneticamente nelle frazioni *Lin*⁺ e *Lin*⁻. PBMC CFSE⁺ sono stati stimolati con anti-CD3/CD28 per 4 giorni, in presenza delle BM-MDSC, della frazione *Lin*⁺ o della frazione *Lin*⁻. La proliferazione cellulare è stata valutata dopo quattro giorni, marcando le cellule con anti-CD3 e valutando il segnale delle cellule CFSE⁺/CD3⁺ all'interno del gate morfologico. Nel pannello *b.* sono visualizzati tre esempi rappresentativi del profilo CFSE dei linfociti CD3⁺ stimolati in assenza delle BM-MDSC (curva nera), in presenza delle BM-MDSC (curva verde), o delle frazioni separate *Lin*⁺ (curva blu) e *Lin*⁻ (curva rossa). La quantificazione della proliferazione è stata effettuata analizzando la percentuale

delle cellule CFSE⁺/CD3⁺ nel controllo di proliferazione e assumendo tale valore uguale a 100. Rispetto a questo valore è stata quantificata la percentuale della proliferazione dei PBMC stimolati in presenza delle frazioni separate immunomagneticamente. Nel pannello *c.* è rappresentata la media \pm SE di 6 esperimenti indipendenti. Il valore della *p* è indicato e si riferisce al controllo privo dell'aggiunta delle BM-MDSC.

e., f., g. PBMC CFSE⁺ sono stati stimolati con anti-CD3/CD28 per 4 giorni, in presenza delle BM-MDSC o delle frazioni separate *Lin*⁺ e *Lin*⁻. Al quarto giorno di stimolazione, le cellule sono state marcate con anti-CD3 ed è stata quantificata la MFI del CD3 ϵ dei PBMC. Nel pannello *d.* è visualizzato un esempio rappresentativo, in cui in nero è visualizzata la MFI dei PBMC stimolati, in assenza delle BM-MDSC, in blu quello della frazione *Lin*⁺, in rosso quello della frazione *Lin*⁻. In *e.* è visualizzato un esempio rappresentativo della percentuale delle cellule CFSE⁺/CD3⁺, nel pannello di sinistra sono rappresentate le cellule CFSE⁺/CD3⁺ dei PBMC stimolati in assenza delle BM-MDSC; gli altri plot si riferiscono alle cellule CFSE⁺/CD3⁺ in presenza della frazione *Lin*⁺ (pannello centrale) o della frazione *Lin*⁻ (pannello di destra). In *f.* è rappresentata la media \pm SE di 6 esperimenti indipendenti, in cui è stata quantificata la MFI del CD3 ϵ . Il valore della *p* è indicato e si riferisce al controllo privo dell'aggiunta delle BM-MDSC.

Come si può osservare in Figura 16*c.* e *d.* in cui sono visualizzati tre esempi rappresentativi e la media di 6 esperimenti indipendenti, la popolazione *Lin* negativa esercita una notevole azione soppressoria, superiore a quella esercitata dalle BM-MDSC ($p < 0.001$) e dalla frazione *Lin*⁺, suggerendo quindi che nella frazione *Lin*⁻ ci sia un arricchimento delle popolazioni con più alta capacità immunosoppressoria, anche se l'inibizione della proliferazione linfocitaria viene mantenuta anche dalla componente *Lin*⁺.

In questi stessi esperimenti abbiamo osservato inoltre che l'espressione della catena CD3 ϵ di superficie era notevolmente diminuita. Come si può notare in Figura 16 (pannelli *e., f.* e *g.*), la soppressione della proliferazione linfocitaria da parte della popolazione *Lin* negativa è accompagnata da una riduzione della MFI del CD3 ϵ dei linfociti ($p = 0.014$). Invece, a differenza di quanto osservato per la proliferazione linfocitaria, la frazione *Lin*⁺ non è in grado di diminuire in modo statisticamente significativo la MFI del CD3 ϵ . Nei pannelli *e.* ed *f.* sono visibili due esempi rappresentativi della riduzione sia della MFI che della percentuale delle cellule CFSE⁺/CD3⁺, indotta dalla frazione *Lin* negativa. In conclusione questi dati indicano che la soppressione indotta dalla frazione *Lin* negativa presente nelle BM-MDSC si associa con una elevata soppressione linfocitaria, superiore a quelle osservata con le colture non separate e che è caratterizzata inoltre da una significativa riduzione della MFI del CD3 ϵ di superficie e della percentuale totale dei linfociti CD3⁺.

5. DISCUSSIONE

Numerosi studi hanno ormai chiaramente dimostrato che la progressione tumorale e lo sviluppo neoplastico possono essere accompagnati dall'acquisizione da parte delle cellule tumorali di un fenotipo sempre più aggressivo in grado di eludere i meccanismi di difesa messi in atto dal sistema immunitario. In questo processo le cellule tumorali sfruttano i meccanismi fisiologici di tolleranza e, mediante il rilascio di fattori di crescita, determinano l'espansione di cellule tollerogeniche, che favoriscono la crescita tumorale.

Le MDSC rappresentano una di queste popolazioni con funzione regolatoria negativa, capace di inibire efficacemente l'espansione dei linfociti T, e di indurre importanti disfunzioni del sistema immunitario, sia nel contesto della patologia tumorale che nel corso di infezioni acute e croniche.

Una delle principali caratteristiche delle MDSC è la loro eterogeneità; diversi studi, infatti, indicano le MDSC non come una singola popolazione cellulare, ma piuttosto come un insieme di cellule mieloidi immature a diversi stadi di differenziazione del *lineage* mieloido che sono però accomunate nella loro funzione principale e cioè il controllo dei linfociti attivati. L'espansione delle MDSC è indotta da diversi fattori rilasciati dalle cellule tumorali (65) e per questo motivo il loro fenotipo è influenzato dal microambiente tumorale; inoltre possono esprimere diversi marcatori di superficie a seconda dello stadio di differenziazione mieloido. In accordo con queste osservazioni ci sono evidenze sia in modelli preclinici sia in pazienti con tumore che le MDSC possono avere sia caratteristiche granulocitarie che monocitarie (39, 44, 45, 56).

Allo scopo di individuare le caratteristiche fenotipiche delle MDSC, in questo studio abbiamo analizzato diverse sottopopolazioni leucocitarie isolate dal sangue di pazienti con carcinoma del colon e melanoma: i nostri risultati hanno dimostrato che cellule mieloidi con attività soppressoria possono essere espanse sia nella popolazione granulocitaria che in quella monocitaria di pazienti affetti da tumore.

E' interessante notare che anche nel topo esistono due sottopopolazioni principali di MDSC: una di tipo granulocitario ($CD11b^+LY6G^+LY6C^{low}$) ed una monocitaria ($CD11b^+LY6G^-LY6C^{high}$). Entrambe, seppure con diversi meccanismi

di azione, sono in grado di inibire la proliferazione antigene specifica delle cellule T(39).

Un altro aspetto chiave che riguarda le MDSC è l'identificazione di marcatori, utili a riconoscere in maniera chiara l'espansione di tale popolazione in pazienti affetti da tumore. I nostri risultati indicano che l'espressione della catena α del recettore dell'interleuchina 4 è aumentata sia nella popolazione granulocitaria che in quella monocitaria dei pazienti affetti da tumore, anche se questa espansione correla con l'attività soppressoria esclusivamente per le cellule mononucleate.

I nostri dati sono in accordo ai risultati ottenuti sulle MDSC in modelli animali portatori di tumore, in cui $IL4R\alpha$ si è rivelato un marcatore utile per discriminare le popolazioni monocitarie con attività immunosoppressoria rispetto alle sottopopolazioni di tipo granulocitario, prive invece di tale funzione inibitoria (41).

L'espansione delle MDSC è regolata da molti fattori proteici che vengono secreti dalle cellule tumorali, dalle cellule stromali, dai linfociti T attivati e dai macrofagi. I fattori di crescita rilasciati modulano il reclutamento delle MDSC attraverso due processi: la stimolazione della mielopoiesi e l'inibizione del processo di differenziazione dei progenitori mieloidi a cellule mature. D'altra parte i fattori di crescita tumorali rivestono un ruolo fondamentale anche nel processo di attivazione delle MDSC; infatti, contribuiscono alla produzione di ROS e di citochine soppressive come il $TGF\beta$ e all'aumento dell'espressione di arginasi I e iNOS da parte delle MDSC.

In questo lavoro abbiamo dimostrato che le MDSC possono essere generate attraverso un semplice sistema di coltura *in vitro* trattando il sangue midollare con G-CSF, GM-CSF e IL-6, citochine che non solo sono rilasciate fisiologicamente durante i processi infiammatori, ma che sono anche presenti nel microambiente tumorale.

Da numerosi studi è noto che sia il GM-CSF che il G-CSF hanno ruolo nella promozione della progressione tumorale sia *in vitro* che *in vivo*, nonostante siano stati utilizzati anche nella terapia anti-tumorale. Inoltre l'aumento dell'IL-6 in molti tipi di tumore è stato associato ad una cattiva prognosi ed alcuni studi recenti hanno mostrato che l'IL-6 potrebbe essere rilasciata abbastanza precocemente durante lo

sviluppo neoplastico sia dalle cellule trasformate, sia dalle cellule mieloidi infiltranti il tumore (111).

Il trattamento con diverse combinazioni di G-CSF, GM-CSF e IL-6 induce la proliferazione e l'espansione di progenitori mieloidi immaturi. Le cellule mieloidi presenti nel sangue midollare in assenza dell'adeguato stimolo citochinico sembrano differenziare più velocemente verso le forme più mature del *commitment* granulocitario. La nostra ipotesi quindi è che i fattori di crescita potrebbero agire non tanto inducendo un rallentamento del processo di differenziazione della linea mielo-monocitaria, quanto, invece, sostenendo la vitalità e la proliferazione proprio di queste popolazioni di progenitori mieloidi immaturi.

Dai nostri dati emerge come i fattori di crescita utilizzati siano anche in grado di modulare l' IL4R α , aumentandone l'espressione su tutte le popolazioni mieloidi, dalle più immature fino ai granulociti maturi, mentre fisiologicamente l'espressione di tale recettore è molto bassa sulle cellule mieloidi mature, sia granulociti che monociti, ma è però presente sugli elementi più immaturi. I nostri risultati quindi suggeriscono che il trattamento delle cellule di midollo con le citochine permette di espandere cellule mieloidi immature analoghe a quelle individuate nel sangue periferico di pazienti con tumore.

Le cellule mieloidi ottenute da sangue midollare dopo trattamento con i fattori di crescita inibiscono efficacemente la proliferazione linfocitaria; inoltre, tali cellule esprimono non solo i marcatori della linea mioide, come il CD14, il CD15 e il CD11b, ma anche l' IL4R α , che sono tipicamente associati alle MDSC, infine comprendono cellule immature a vari stadi di differenziazione. Per tutti questi motivi possono essere definite cellule mieloidi soppressorie di derivazione midollare (BM-MDSC).

Dai nostri dati è emerso che il trattamento con il G-CSF, nonostante induca l'aumento delle popolazioni mieloidi IL4R α^+ , non è tuttavia in grado da solo di sostenere la funzione inibitoria delle cellule mieloidi. Invece il GM-CSF in combinazione con il G-CSF o con l'IL-6 induce la completa maturazione fenotipica e funzionale delle BM-MDSC. Questo suggerisce che l'espressione dell' IL4R α sia una condizione necessaria, ma non sufficiente per l'attività immunosoppressoria delle

BM-MDSC, ma va inoltre sottolineato il fatto che questa molecola è, analogamente a quanto dimostrato per il topo, verosimilmente coinvolta nella modulazione dei meccanismi molecolari anche nell'uomo; infatti, in alcuni esperimenti preliminari un inibitore in grado di bloccare l'azione di IL-4 e IL-13 ha diminuito efficacemente l'effetto soppressorio esercitato dalle BM-MDSC.

E' stato dimostrato che il rilascio di IFN- γ da parte dei linfociti T CD8⁺ induce la secrezione da parte delle BM-MDSC di IL-13 e IFN- γ , molecole che a loro volta sono in grado di attivare il programma soppressorio modulando l'espressione dell'arginasi I e di iNOS (41). Anche nel nostro modello *in vitro* è emerso che il *cross talking* tra i linfociti attivati e le BM-MDSC è fondamentale ai fini della proliferazione del pool linfocitario. In particolare, abbiamo osservato che l'attività soppressoria delle BM-MDSC dipende dallo stato di attivazione dei linfociti T; infatti in presenza di una scarsa proliferazione linfocitaria le BM-MDSC non sono più in grado di esercitare la loro azione inibitoria e questo ci suggerisce che il "priming" di queste cellule dipenda dallo stato di attivazione linfocitaria. Questi risultati sono confermati anche dal fatto che le BM-MDSC sono in grado di inibire la soppressione dei linfociti attivati con anti-CD3 e anti-CD28, stimoli che inducono una massiccia amplificazione dei segnali del TCR.

Le BM-MDSC sono in grado di inibire la proliferazione linfocitaria solo se poste in contatto con i linfociti T. Questa osservazione è in accordo con altri studi, in cui è stato dimostrato che le MDSC sono in grado di sopprimere la risposta linfocitaria mediante il contatto cellula-cellula (113). La prossimità fisica tra MDSC e cellule T faciliterebbe l'alterazione delle molecole di superficie linfocitarie indotta dalle MDSC mediante il rilascio di ROS e perossinitriti.

Uno dei meccanismi più noti di soppressione delle MDSC è la diminuzione dell'espressione della catena ζ del TCR, un fenomeno già documentato in molti pazienti; in assenza della catena ζ i linfociti CD8⁺ non sono più in grado di trasmettere il segnale per la loro attivazione e quindi vanno incontro a processi di apoptosi (114-116). Anche nel nostro studio abbiamo osservato una diminuzione dell'espressione della catena ζ del TCR nei linfociti in seguito all'interazione con le

BM-MDSC. Questo meccanismo di soppressione è stato associato al metabolismo della L-arginina, un amminoacido semiessenziale che è il substrato di arginasi I e di iNOS. L'attivazione dell'arginasi comporta una diminuzione dell'arginina nel microambiente tumorale con conseguente diminuzione della catena ζ del CD3. Nel nostro caso, tuttavia, l'utilizzo di inibitori dell'arginasi non ha permesso un recupero della proliferazione linfocitaria in presenza delle BM-MDSC (dati non mostrati).

Tutti i fattori di crescita che abbiamo utilizzato per l'induzione di BM-MDSC agiscono attraverso il fattore di trascrizione C/EBP β (112, 117-119). Questo fattore trascrizionale appartiene ad una famiglia di proteine che rivestono un ruolo chiave nella regolazione di vari aspetti della differenziazione cellulare e controllano molteplici funzioni dei processi dell'infiammazione e della differenziazione mieloide. Gli stimoli infiammatori possono indurre l'espressione di C/EBP β in diversi tessuti e l'espressione di diverse isoforme della proteina può essere modulata durante la differenziazione dei macrofagi e dei granulociti (120). C/EBP α ed ϵ regolano la differenziazione mieloide in condizioni fisiologiche, mentre C/EBP β riveste un ruolo fondamentale nella regolazione della mielopoiesi indotta da condizioni infiammatorie e di stress. Alcuni geni espressi in cellule mielomonocitarie, come il G-CSF, l'IL-6, l'IL-1 β , il TNF α , l'IL-8 e l'IL-12 ed inoltre geni che codificano per proteine importanti per le funzioni di macrofagi e granulociti, come il lisozima, la mieloperossidasi, l'elastasi mantengono a livello delle loro sequenze regolatorie dei siti di legame per C/EBP β (117).

Nel nostro studio abbiamo indagato il coinvolgimento del C/EBP β nello sviluppo e nella funzione delle BM-MDSC ed abbiamo dimostrato che l'induzione di questa popolazione tolerogena dipende da questo fattore trascrizionale. Questi risultati inoltre supportano l'ipotesi che le MDSC non siano presenti in condizioni di ematopoiesi "*steady state*", ma che siano invece rilasciate e attivate quando vengono messi in moto programmi di mielopoiesi alternativi, che dipendono da C/EBP β . Inoltre questo dato identifica un nuovo obiettivo di potenziale interesse per lo sviluppo di nuove terapie antitumorali, che abbiano lo scopo di bloccare un importante fenomeno di tolleranza dei tumori.

Le BM-MDSC indotte dal trattamento con i fattori di crescita sono costituite da diverse popolazioni cellulari a vari stadi di differenziazione che variano dalle cellule più immature fino ai granulociti maturi. L'eterogeneità di queste popolazioni indotte *in vitro*, che comporta una attività soppressoria variabile nei diversi campioni biologici, può dipendere non solo dalla variabilità genetica di ciascun individuo, ma anche da una diversa responsività cellulare agli stimoli con i fattori di crescita. Questo comporta che le BM-MDSC possono essere indotte in percentuali variabili nelle diverse colture.

I nostri risultati indicano che la frazione *Lineage* negativa separata dalle BM-MDSC, arricchita nelle popolazioni mieloidi più immature (mieloblasti, monoblasti e promielociti), è dotata di una maggiore capacità soppressoria anche se la frazione *Lineage* positiva mantiene la capacità di esercitare un effetto di inibizione della proliferazione linfocitaria a livelli inferiori. Ulteriori tentativi di separazione della frazione *Lin*⁻ con i marcatori CD11b o per l'HLA-DR non ci hanno fornito indicazioni chiare (dati non mostrati). Questi dati quindi indicano che le BM-MDSC non sono confinate in uno stadio di differenziazione ben delimitato, ma appartengono a più popolazioni immature, che variano dai monoblasti/mieloblasti fino alle cellule a banda che esprimono IL4R α . Inoltre va sottolineato il fatto che queste popolazioni immature, normali costituenti del midollo, non sono di per sé in grado di esercitare un effetto soppressorio sui linfociti attivati, ma necessitano del “*priming*” da parte di fattori di crescita per poter esplicare il loro programma soppressorio. Le citochine che abbiamo identificato in questo studio molto probabilmente non sono le uniche in grado di agire in questo senso, ma certamente rappresentano dei mediatori molto comuni di questo processo, data la loro frequente presenza nel microambiente tumorale.

RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo percorso di ricerca desidero ringraziare tutte le persone che hanno reso possibile questo lavoro, facendomi crescere scientificamente e continuando a credere in me e ad incoraggiarmi ogni giorno.

Vorrei ringraziare Susanna per aver contribuito alla realizzazione di questo progetto, alla stesura della tesi e alla mia preparazione scientifica, insegnandomi ogni giorno ad esigere sempre di più da me stessa e non ultimo per aver creduto in me.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Viola per avermi indirizzato e al Dott. Bronte e alla Prof. Zanovello per avermi affidato questo progetto di dottorato con fiducia e disponibilità.

Desidero ringraziare il Prof. Basso per avermi fornito il materiale biologico e soprattutto Samuela per avermi aiutata prima nella vita di laboratorio e poi nel "reclutamento" dei midolli.

Un ringraziamento particolare a tutto il lab 10, per avermi insegnato a confrontarmi con voi e perché ho imparato anche negli spazi angusti, stressanti e rumorosi del nostro laboratorio è possibile trovare un mondo di amicizia. Grazie ad Erika per aver condiviso questi tre anni con me, nelle gioie e dolori di questo progetto, ma ancora di più per avermi aiutato nella parte delle letture ed analisi ai citofluorimetro, senza mai stancarsi. Grazie a Fiorenza per avermi dato le basi del Corel, per avermi insegnato che anche se a casa non si è ordinati, in lab. lo si può essere e per avermi aiutato nella parte della biologia molecolare. Grazie ad Ari che riesce sempre a farmi spuntare il sorriso, anche nei giorni più bui..

In questi anni ho avuto anche la possibilità di seguire delle persone in formazione..Giulio, Sarah, Speranza, Paul e Laura..grazie anche a voi per avermi sopportato e perché ho imparato che non è così banale "insegnare il mestiere"e che la pazienza...è la virtù dei forti..

Un ringraziamento doveroso va ad Elisa per avermi insegnato la vita in p3 e a Gigi per avermi aiutato in molte cose, che non posso qui elencare, perché sarebbero troppo..Grazie anche ad Anna e ad Elisabetta, per le chiacchierate e i

consigli la sera tardi o la mattina presto..Un ringraziamento a Ilaria e Stefano perché nella loro dedizione alla ricerca, sono un esempio.

Desidero ringraziare sinceramente la mia famiglia: i miei genitori che mi hanno sempre spronato a fare meglio credendo in me ed aiutandomi ogni giorno ad affrontare la vita con sicurezza e in maniera critica e mia sorella Simona, che, anche se non riesce ancora a farsi una ragione se ho scelto questo mestiere, cerca di capirmi e di sostenermi sempre, preoccupandosi per me e dandomi preziosi consigli di vita. Grazie anche ai miei nonni che sono riusciti dopo molte speranze a vedere questa tesi ultimata e alle mie nonne che, anche se non ci sono più, so che sarebbero orgogliose di me..

Un ringraziamento a Sarah per essere cresciuta con me nelle difficoltà della vita a Padova, dai traslochi alle pulizie e perché tra laurea e dottorato e scuola di specializzazione sono 10 anni che mi sopporta tra le mura domestiche.

Grazie a Ilaria e Lisa, le mie migliori amiche che in questi anni a Padova hanno "camminato" con me..grazie per le vacanze trascorse insieme, i compleanni, le gite, le chiacchierate, le telefonate.. grazie per avermi insegnato il valore dell'amicizia..

Infine grazie a te, Cris, per aver reso possibile tutto questo, perché so che senza di te sarebbe stato molto più difficile. Grazie per avermi incoraggiato, supportato e sopportato..per avermi capita ed aiutata, per aver tollerato tutti i weekend in laboratorio senza mai lamentarti e perché con te accanto tutti i sacrifici valgono la pena..sei la scoperta più bella che abbia fatto!

6. BIBLIOGRAFIA

1. De Plaen, E., C. Lurquin, A. Van Pel, B. Mariame, J. P. Szikora, T. Wolfel, C. Sibille, P. Chomez, and T. Boon. 1988. Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2274-2278.
2. van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, N.Y.)* 254:1643-1647.
3. Novellino, L., C. Castelli, and G. Parmiani. 2005. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother* 54:187-207.
4. Sensi, M., and A. Anichini. 2006. Unique tumor antigens: evidence for immune control of genome integrity and immunogenic targets for T cell-mediated patient-specific immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12:5023-5032.
5. Lucas, S., E. De Plaen, and T. Boon. 2000. MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 87:55-60.
6. Ohnmacht, G. A., and F. M. Marincola. 2000. Heterogeneity in expression of human leukocyte antigens and melanoma-associated antigens in advanced melanoma. *Journal of cellular physiology* 182:332-338.
7. Mocellin, S., S. Mandruzzato, V. Bronte, M. Lise, and D. Nitti. 2004. Part I: Vaccines for solid tumours. *The lancet oncology* 5:681-689.
8. Coussens, L. M., and Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867.
9. Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-444.
10. Bierie, B., and H. L. Moses. 2006. TGF-beta and cancer. *Cytokine & growth factor reviews* 17:29-40.
11. Pikarsky, E., R. M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gutkovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, and Y. Ben-Neriah. 2004. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431:461-466.
12. Yu, H., M. Kortylewski, and D. Pardoll. 2007. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Immunology* 7:41-51.
13. Wang, T., G. Niu, M. Kortylewski, L. Burdelya, K. Shain, S. Zhang, R. Bhattacharya, D. Gabilovich, R. Heller, D. Coppola, W. Dalton, R. Jove, D. Pardoll, and H. Yu. 2004. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nature medicine* 10:48-54.

14. Shojaei, F., X. Wu, C. Zhong, L. Yu, X. H. Liang, J. Yao, D. Blanchard, C. Bais, F. V. Peale, N. van Bruggen, C. Ho, J. Ross, M. Tan, R. A. Carano, Y. G. Meng, and N. Ferrara. 2007. Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* 450:825-831.
15. Burger, J. A., and T. J. Kipps. 2006. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107:1761-1767.
16. Kulbe, H., R. Thompson, J. L. Wilson, S. Robinson, T. Hagemann, R. Fatah, D. Gould, A. Ayhan, and F. Balkwill. 2007. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer research* 67:585-592.
17. Prehn, R. T., and J. M. Main. 1957. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 18:769-778.
18. Klein, E., and G. Klein. 1964. Antigenic Properties of Lymphomas Induced by the Moloney Agent. *J Natl Cancer Inst* 32:547-568.
19. Burnet, F. M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research. Fortschritte der experimentellen Tumorforschung* 13:1-27.
20. Hewitt, H. B., E. R. Blake, and A. S. Walder. 1976. A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *British journal of cancer* 33:241-259.
21. Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 3:991-998.
22. Swann, J. B., and M. J. Smyth. 2007. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117:1137-1146.
23. Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775-787.
24. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nature reviews* 8:523-532.
25. Solinas, G., G. Germano, A. Mantovani, and P. Allavena. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86:1065-1073.
26. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe. 2006. 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.
27. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science (New York, N.Y.)* 290:92-97.
28. Ghiringhelli, F., P. E. Puig, S. Roux, A. Parcellier, E. Schmitt, E. Solary, G. Kroemer, F. Martin, B. Chauffert, and L. Zitvogel. 2005. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *The Journal of experimental medicine* 202:919-929.
29. Salio, M., and V. Cerundolo. 2009. Linking inflammation to natural killer T cell activation. *PLoS biology* 7:e1000226.
30. Cerundolo, V., J. D. Silk, S. H. Masri, and M. Salio. 2009. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nature reviews.Immunology* 9:28-38.

31. De Santo, C., M. Salio, S. H. Masri, L. Y. Lee, T. Dong, A. O. Speak, S. Porubsky, S. Booth, N. Veerapen, G. S. Besra, H. J. Grone, F. M. Platt, M. Zamboni, and V. Cerundolo. 2008. Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* 118:4036-4048.
32. Strober, S. 1984. Natural suppressor (NS) cells, neonatal tolerance, and total lymphoid irradiation: exploring obscure relationships. *Annual Review of Immunology* 2:219-237.
33. Gabrilovich, D. I., V. Bronte, S. H. Chen, M. P. Colombo, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg, and H. Schreiber. 2007. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67:425; author reply 426.
34. Sica, A., and V. Bronte. 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of clinical investigation* 117:1155-1166.
35. Gabrilovich, D. I., and S. Nagaraj. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews* 9:162-174.
36. Bronte, V., E. Apolloni, A. Cabrelle, R. Ronca, P. Serafini, P. Zamboni, N. P. Restifo, and P. Zanovello. 2000. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96:3838-3846.
37. Dietlin, T. A., F. M. Hofman, B. T. Lund, W. Gilmore, S. A. Stohlman, and R. C. van der Veen. 2007. Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion. *Journal of leukocyte biology* 81:1205-1212.
38. Movahedi, K., M. Guillemins, J. Van den Bossche, R. Van den Bergh, C. Gysemans, A. Beschin, P. De Baetselier, and J. A. Van Ginderachter. 2008. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111:4233-4244.
39. Youn, J. I., S. Nagaraj, M. Collazo, and D. I. Gabrilovich. 2008. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181:5791-5802.
40. Zhu, B., Y. Bando, S. Xiao, K. Yang, A. C. Anderson, V. K. Kuchroo, and S. J. Khoury. 2007. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179:5228-5237.
41. Gallina, G., L. Dolcetti, P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, M. P. Colombo, G. Basso, F. Brombacher, I. Borrello, P. Zanovello, S. Bicchato, and V. Bronte. 2006. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation* 116:2777-2790.
42. Huang, B., P. Y. Pan, Q. Li, A. I. Sato, D. E. Levy, J. Bromberg, C. M. Divino, and S. H. Chen. 2006. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research* 66:1123-1131.
43. Yang, R., Z. Cai, Y. Zhang, W. H. t. Yutzy, K. F. Roby, and R. B. Roden. 2006. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer research* 66:6807-6815.

44. Filipazzi, P., R. Valenti, V. Huber, L. Pilla, P. Canese, M. Iero, C. Castelli, L. Mariani, G. Parmiani, and L. Rivoltini. 2007. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25:2546-2553.
45. Hoechst, B., L. A. Ormandy, M. Ballmaier, F. Lehner, C. Kruger, M. P. Manns, T. F. Greten, and F. Korangy. 2008. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* 135:234-243.
46. Mirza, N., M. Fishman, I. Fricke, M. Dunn, A. M. Neuger, T. J. Frost, R. M. Lush, S. Antonia, and D. I. Gabrilovich. 2006. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer research* 66:9299-9307.
47. Rodriguez, P. C., M. S. Ernstoff, C. Hernandez, M. Atkins, J. Zabaleta, R. Sierra, and A. C. Ochoa. 2009. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer research* 69:1553-1560.
48. Srivastava, M. K., J. J. Bosch, J. A. Thompson, B. R. Ksander, M. J. Edelman, and S. Ostrand-Rosenberg. 2008. Lung cancer patients' CD4(+) T cells are activated in vitro by MHC II cell-based vaccines despite the presence of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 57:1493-1504.
49. Pak, A. S., M. A. Wright, J. P. Matthews, S. L. Collins, G. J. Petruzzelli, and M. R. Young. 1995. 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.
50. Young, M. R., K. Kolesiak, M. A. Wright, and D. I. Gabrilovich. 1999. Chemoattraction of femoral CD34+ progenitor cells by tumor-derived vascular endothelial cell growth factor. *Clinical & experimental metastasis* 17:881-888.
51. Young, M. R., G. J. Petruzzelli, K. Kolesiak, N. Achille, D. M. Lathers, and D. I. Gabrilovich. 2001. Human squamous cell carcinomas of the head and neck chemoattract immune suppressive CD34(+) progenitor cells. *Human immunology* 62:332-341.
52. Almand, B., J. I. Clark, E. Nikitina, J. van Beynen, N. R. English, S. C. Knight, D. P. Carbone, and D. I. Gabrilovich. 2001. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 166:678-689.
53. Kusmartsev, S., F. Cheng, B. Yu, Y. Nefedova, E. Sotomayor, R. Lush, and D. Gabrilovich. 2003. All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer research* 63:4441-4449.
54. Nefedova, Y., M. Fishman, S. Sherman, X. Wang, A. A. Beg, and D. I. Gabrilovich. 2007. Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* 67:11021-11028.
55. Kusmartsev, S., Z. Su, A. Heiser, J. Dannull, E. Eruslanov, H. Kubler, D. Yancey, P. Dahm, and J. Vieweg. 2008. Reversal of myeloid cell-mediated

- immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 14:8270-8278.
56. Zea, A. H., P. C. Rodriguez, M. B. Atkins, C. Hernandez, S. Signoretti, J. Zabaleta, D. McDermott, D. Quiceno, A. Youmans, A. O'Neill, J. Mier, and A. C. Ochoa. 2005. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer research* 65:3044-3048.
 57. Schmielau, J., and O. J. Finn. 2001. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res* 61:4756-4760.
 58. Schmielau, J., M. A. Nalesnik, and O. J. Finn. 2001. Suppressed T-cell receptor zeta chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 7:933s-939s.
 59. Valenti, R., V. Huber, P. Filipazzi, L. Pilla, G. Sovena, A. Villa, A. Corbelli, S. Fais, G. Parmiani, and L. Rivoltini. 2006. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res* 66:9290-9298.
 60. Serafini, P., S. Mgebhoff, K. Noonan, and I. Borrello. 2008. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer research* 68:5439-5449.
 61. Hoechst, B., T. Voigtlaender, L. Ormandy, J. Gamrekelashvili, F. Zhao, H. Wedemeyer, F. Lehner, M. P. Manns, T. F. Greten, and F. Korangy. 2009. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology (Baltimore, Md)* 50:799-807.
 62. Diaz-Montero, C. M., M. L. Salem, M. I. Nishimura, E. Garrett-Mayer, D. J. Cole, and A. J. Montero. 2009. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 58:49-59.
 63. Ko, J. S., A. H. Zea, B. I. Rini, J. L. Ireland, P. Elson, P. Cohen, A. Golshayan, P. A. Rayman, L. Wood, J. Garcia, R. Dreicer, R. Bukowski, and J. H. Finke. 2009. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 15:2148-2157.
 64. Liu, C. Y., Y. M. Wang, C. L. Wang, P. H. Feng, H. W. Ko, Y. H. Liu, Y. C. Wu, Y. Chu, F. T. Chung, C. H. Kuo, K. Y. Lee, S. M. Lin, H. C. Lin, C. H. Wang, C. T. Yu, and H. P. Kuo. 2009. Population alterations of L: -arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b(+)/CD14 (-)/CD15 (+)/CD33 (+) myeloid-derived suppressor cells and CD8 (+) T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*.
 65. Ostrand-Rosenberg, S., and P. Sinha. 2009. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182:4499-4506.
 66. Song, X., Y. Krelin, T. Dvorkin, O. Bjorkdahl, S. Segal, C. A. Dinarello, E. Voronov, and R. N. Apte. 2005. CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175:8200-8208.

67. Ochoa, A. C., A. H. Zea, C. Hernandez, and P. C. Rodriguez. 2007. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13:721s-726s.
68. Sinha, P., V. K. Clements, A. M. Fulton, and S. Ostrand-Rosenberg. 2007. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* 67:4507-4513.
69. Cheng, P., C. A. Corzo, N. Luetkeke, B. Yu, S. Nagaraj, M. M. Bui, M. Ortiz, W. Nacken, C. Sorg, T. Vogl, J. Roth, and D. I. Gabrilovich. 2008. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *The Journal of experimental medicine* 205:2235-2249.
70. Sinha, P., C. Okoro, D. Foell, H. H. Freeze, S. Ostrand-Rosenberg, and G. Srikrishna. 2008. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181:4666-4675.
71. Markiewski, M. M., R. A. DeAngelis, F. Benencia, S. K. Ricklin-Lichtsteiner, A. Koutoulaki, C. Gerard, G. Coukos, and J. D. Lambris. 2008. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nature immunology* 9:1225-1235.
72. Kusmartsev, S., and D. I. Gabrilovich. 2005. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174:4880-4891.
73. Bronte, V., P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, V. Tosello, A. Mazzoni, D. M. Segal, C. Staib, M. Lowel, G. Sutter, M. P. Colombo, and P. Zanovello. 2003. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170:270-278.
74. Terabe, M., S. Matsui, J. M. Park, M. Mamura, N. Noben-Trauth, D. D. Donaldson, W. Chen, S. M. Wahl, S. Ledbetter, B. Pratt, J. J. Letterio, W. E. Paul, and J. A. Berzofsky. 2003. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *The Journal of experimental medicine* 198:1741-1752.
75. Bronte, V., and P. Zanovello. 2005. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews.Immunology* 5:641-654.
76. Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno, and A. C. Ochoa. 2007. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109:1568-1573.
77. Rodriguez, P. C., A. H. Zea, K. S. Culotta, J. Zabaleta, J. B. Ochoa, and A. C. Ochoa. 2002. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *The Journal of biological chemistry* 277:21123-21129.
78. Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, P. G. Holt, and U. R. Kees. 1998. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160:5729-5734.
79. Harari, O., and J. K. Liao. 2004. Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Current pharmaceutical design* 10:893-898.
80. Rivoltini, L., M. Carrabba, V. Huber, C. Castelli, L. Novellino, P. Dalerba, R. Mortarini, G. Arancia, A. Anichini, S. Fais, and G. Parmiani. 2002. Immunity

- to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunological reviews* 188:97-113.
81. Nagaraj, S., K. Gupta, V. Pisarev, L. Kinarsky, S. Sherman, L. Kang, D. L. Herber, J. Schneck, and D. I. Gabrilovich. 2007. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nature medicine* 13:828-835.
 82. Kusmartsev, S., Y. Nefedova, D. Yoder, and D. I. Gabrilovich. 2004. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172:989-999.
 83. Hanson, E. M., V. K. Clements, P. Sinha, D. Ilkovitch, and S. Ostrand-Rosenberg. 2009. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183:937-944.
 84. Yang, L., J. Huang, X. Ren, A. E. Gorska, A. Chytil, M. Aakre, D. P. Carbone, L. M. Matrisian, A. Richmond, P. C. Lin, and H. L. Moses. 2008. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer cell* 13:23-35.
 85. Shojaei, F., X. Wu, A. K. Malik, C. Zhong, M. E. Baldwin, S. Schanz, G. Fuh, H. P. Gerber, and N. Ferrara. 2007. Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nature biotechnology* 25:911-920.
 86. Li, H., Y. Han, Q. Guo, M. Zhang, and X. Cao. 2009. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182:240-249.
 87. Terabe, M., J. Swann, E. Ambrosino, P. Sinha, S. Takaku, Y. Hayakawa, D. I. Godfrey, S. Ostrand-Rosenberg, M. J. Smyth, and J. A. Berzofsky. 2005. A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *The Journal of experimental medicine* 202:1627-1633.
 88. Kusmartsev, S. A., Y. Li, and S. H. Chen. 2000. Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165:779-785.
 89. Watanabe, S., K. Deguchi, R. Zheng, H. Tamai, L. X. Wang, P. A. Cohen, and S. Shu. 2008. Tumor-induced CD11b+Gr-1+ myeloid cells suppress T cell sensitization in tumor-draining lymph nodes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181:3291-3300.
 90. Miller, M. J., O. Safrina, I. Parker, and M. D. Cahalan. 2004. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 200:847-856.
 91. Stoll, S., J. Delon, T. M. Brotz, and R. N. Germain. 2002. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science (New York, N.Y.)* 296:1873-1876.
 92. Gabrilovich, D. I., M. P. Velders, E. M. Sotomayor, and W. M. Kast. 2001. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166:5398-5406.

93. Willimsky, G., M. Czeh, C. Loddenkemper, J. Gellermann, K. Schmidt, P. Wust, H. Stein, and T. Blankenstein. 2008. Immunogenicity of premalignant lesions is the primary cause of general cytotoxic T lymphocyte unresponsiveness. *The Journal of experimental medicine* 205:1687-1700.
94. Kusmartsev, S., E. Eruslanov, H. Kubler, T. Tseng, Y. Sakai, Z. Su, S. Kaliberov, A. Heiser, C. Rosser, P. Dahm, D. Siemann, and J. Vieweg. 2008. Oxidative stress regulates expression of VEGFR1 in myeloid cells: link to tumor-induced immune suppression in renal cell carcinoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181:346-353.
95. Melani, C., S. Sangaletti, F. M. Barazzetta, Z. Werb, and M. P. Colombo. 2007. Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma. *Cancer research* 67:11438-11446.
96. Pan, P. Y., G. X. Wang, B. Yin, J. Ozao, T. Ku, C. M. Divino, and S. H. Chen. 2008. 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.
97. De Santo, C., P. Serafini, I. Marigo, L. Dolcetti, M. Bolla, P. Del Soldato, C. Melani, C. Guiducci, M. P. Colombo, M. Iezzi, P. Musiani, P. Zanovello, and V. Bronte. 2005. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4185-4190.
98. Serafini, P., K. Meckel, M. Kelso, K. Noonan, J. Califano, W. Koch, L. Dolcetti, V. Bronte, and I. Borrello. 2006. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *The Journal of experimental medicine* 203:2691-2702.
99. Talmadge, J. E., K. C. Hood, L. C. Zobel, L. R. Shafer, M. Coles, and B. Toth. 2007. Chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibition reduces immature myeloid suppressor cell expansion. *International immunopharmacology* 7:140-151.
100. Bronte, V., D. B. Chappell, E. Apolloni, A. Cabrelle, M. Wang, P. Hwu, and N. P. Restifo. 1999. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162:5728-5737.
101. Dolcetti, L., E. Peranzoni, S. Ugel, I. Marigo, A. Fernandez Gomez, C. Mesa, M. Geilich, G. Winkels, E. Traggiai, A. Casati, F. Grassi, and V. Bronte. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol* 40:22-35.
102. Parmiani, G., C. Castelli, L. Pilla, M. Santinami, M. P. Colombo, and L. Rivoltini. 2007. Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 18:226-232.
103. Serafini, P., R. Carbley, K. A. Noonan, G. Tan, V. Bronte, and I. Borrello. 2004. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer research* 64:6337-6343.

104. Rutella, S. 2007. Granulocyte colony-stimulating factor for the induction of T-cell tolerance. *Transplantation* 84:S26-30.
105. Braun, B., M. Lange, R. Oeckler, and M. M. Mueller. 2004. Expression of G-CSF and GM-CSF in human meningiomas correlates with increased tumor proliferation and vascularization. *Journal of neuro-oncology* 68:131-140.
106. Mueller, M. M., W. Peter, M. Mappes, A. Huelsen, H. Steinbauer, P. Boukamp, M. Vaccariello, J. Garlick, and N. E. Fusenig. 2001. Tumor progression of skin carcinoma cells in vivo promoted by clonal selection, mutagenesis, and autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *The American journal of pathology* 159:1567-1579.
107. Obermueller, E., S. Vosseler, N. E. Fusenig, and M. M. Mueller. 2004. Cooperative autocrine and paracrine functions of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the progression of skin carcinoma cells. *Cancer research* 64:7801-7812.
108. Massaia, M., A. Bianchi, C. Attisano, S. Peola, V. Redoglia, U. Dianzani, and A. Pileri. 1991. Detection of hyperreactive T cells in multiple myeloma by multivalent cross-linking of the CD3/TCR complex. *Blood* 78:1770-1780.
109. Stetler-Stevenson, M., D. C. Arthur, N. Jabbour, X. Y. Xie, J. Mouldrem, A. J. Barrett, D. Venzon, and M. E. Rick. 2001. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 98:979-987.
110. Elghetany, M. T., Y. Ge, J. Patel, J. Martinez, and H. Uhrova. 2004. Flow cytometric study of neutrophilic granulopoiesis in normal bone marrow using an expanded panel of antibodies: correlation with morphologic assessments. *Journal of clinical laboratory analysis* 18:36-41.
111. Kishimoto, T. 2005. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 23:1-21.
112. Hirai, H., P. Zhang, T. Dayaram, C. J. Hetherington, S. Mizuno, J. Imanishi, K. Akashi, and D. G. Tenen. 2006. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* 7:732-739.
113. Nagaraj, S., and D. I. Gabrilovich. 2008. Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 68:2561-2563.
114. Ezernitchi, A. V., I. Vaknin, L. Cohen-Daniel, O. Levy, E. Manaster, A. Halabi, E. Pikarsky, L. Shapira, and M. Baniyash. 2006. TCR zeta down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs. *J Immunol* 177:4763-4772.
115. Baniyash, M. 2004. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nature reviews* 4:675-687.
116. Dworacki, G., N. Meidenbauer, I. Kuss, T. K. Hoffmann, W. Gooding, M. Lotze, and T. L. Whiteside. 2001. Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 7:947s-957s.
117. Poli, V. 1998. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273:29279-29282.
118. Akagi, T., T. Saitoh, J. O'Kelly, S. Akira, A. F. Gombart, and H. P. Koeffler. 2008. Impaired response to GM-CSF and G-CSF, and enhanced apoptosis in C/EBPbeta-deficient hematopoietic cells. *Blood* 111:2999-3004.

119. Spooner, C. J., X. Guo, P. F. Johnson, and R. C. Schwartz. 2007. Differential roles of C/EBP beta regulatory domains in specifying MCP-1 and IL-6 transcription. *Molecular immunology* 44:1384-1392.
120. Rosenbauer, F., and D. G. Tenen. 2007. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nature reviews* 7:105-117.