



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
“TOR VERGATA”**

**FACOLTÀ DI MEDICINA**

**DOTTORATO DI RICERCA  
IN MICROBIOLOGIA MEDICA  
E IMMUNOLOGIA**

**XX CICLO**

**Titolo della tesi:**

**Il GM-CSF può promuovere il differenziamento  
di monociti umani in cellule dendritiche dotate di distinte  
proprietà immuno-stimolatorie e migratorie: ruolo  
dell'espressione del recettore del GM-CSF**

**Dottorando:  
Dr. Marco Cardone**

**Docente Guida/Tutor:  
Dr.ssa Sandra Gessani**

**Coordinatore:  
Prof. Carlo Federico Perno**

## **- Sommario -**

### **Introduzione**

<i>Le cellule dendritiche: caratteristiche fenotipiche e funzionali.....</i>	<i>3</i>
<i>Ontogenesi: macrofago o DC ?.....</i>	<i>12</i>
<i>Caratteristiche del GM-CSF.....</i>	<i>14</i>

<b><u>Scopo del Lavoro</u></b> .....	<i>16</i>
--------------------------------------	-----------

### **Materiali e Metodi**

<i>Generazione in vitro delle DC e dei macrofagi.....</i>	<i>18</i>
<i>Analisi fenotipica.....</i>	<i>20</i>
<i>Saggio di cattura dell'antigene.....</i>	<i>23</i>
<i>Saggio di chemiotassi.....</i>	<i>24</i>
<i>Saggio della Reazione Leucocitaria Mista.....</i>	<i>26</i>
<i>Saggio di proliferazione delle cellule T con CFSE.....</i>	<i>28</i>
<i>Determinazione dei livelli di citochine e chemochine.....</i>	<i>30</i>

## **Risultati**

<i>I monociti del sangue periferico presentano una variabilità, dipendente dal donatore, nella densità di superficie della subunità <math>\alpha</math> del GM-CSFR.....</i>	<i>32</i>
<i>I livelli di espressione del GM-CSFR<math>\alpha</math> nei monociti correlano con la loro capacità di differenziare in macrofagi o DC in risposta al GM-CSF.....</i>	<i>34</i>
<i>Le cellule CD1a<sup>+</sup> generate da colture di monociti trattate con GM-CSF presentano caratteristiche fenotipiche proprie delle DC immature.....</i>	<i>38</i>
<i>Le DC generate con GM-CSF vanno incontro a maturazione fenotipica in seguito a stimolazione dei TLRs.....</i>	<i>40</i>
<i>Le GM-DC sono in grado di migrare in risposta alle chemochine CCL4 e CCL19.....</i>	<i>43</i>
<i>Le GM-DC inducono l'espansione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e produzione di IFN-<math>\gamma</math>.....</i>	<i>45</i>
<i>Le GM-DC secernono costitutivamente la CCL1 e producono citochine e chemochine infiammatorie, dopo maturazione.....</i>	<i>47</i>
<i>La neutralizzazione dell'IL-10 prodotta dalle GM-DC stimulate con LPS induce in queste cellule produzione di IL-12 e ne incrementa l'attività allostimolatoria.....</i>	<i>49</i>
<b><u>Discussione</u>.....</b>	<b><i>62</i></b>
<b><u>Bibliografia</u>.....</b>	<b><i>71</i></b>
<b><u>Indice delle Figure e delle Tabelle</u>.....</b>	<b><i>80</i></b>

## **- Introduzione -**

### *Le cellule dendritiche: caratteristiche fenotipiche e funzionali*

Le cellule dendritiche (DC) costituiscono una sottopopolazione eterogenea di leucociti presente, in piccola percentuale e a diversi stadi dello sviluppo, nel circolo sanguigno, nella linfa, nell'epidermide, nelle mucose e negli organi linfoidi. Le DC sono le uniche cellule in grado di presentare l'antigene ai linfociti T *naive*, esibendo quindi una proprietà funzionale che è fondamentale e irrinunciabile per promuovere la risposta immune primaria ed instaurare la memoria immunologica. In più, sono abili, oltre che nell'indurre, anche nel regolare il tipo di risposta immune mediata dai linfociti T e/o B e possono avere funzione tollerogenica come garanzia di prevenzione contro l'autoimmunità.

Le DC esistono principalmente in due stadi di sviluppo, caratterizzati da proprietà fenotipiche e funzionali distinte. Si parla, infatti, di DC immature (iDC), attive soprattutto nel catturare e processare l'antigene, e di DC mature (mDC) che

invece sono abili nel presentare quest'ultimo ai linfociti T *naive*. Le DC sono in grado di muoversi nell'organismo per chemiotassi, guidate da proteine con caratteristiche chemioattrattive, conosciute come chemochine. Le chemochine possono essere rilasciate costitutivamente oppure in risposta a segnali infiammatori dai leucociti attivati nonché da cellule stromali, endoteliali o epiteliali. Quelle costitutive come *stromal cell-derived factor* (SDF-1) e *macrophage-derived chemokine* (MDC), prodotte a livello dei tessuti periferici, dirigono il normale ricircolo fisiologico delle cellule responsive, mentre quelle inducibili come CCL1, CCL2, CCL3 e CCL4 sono responsabili del reclutamento rapido nei siti d'infiammazione (*Sozzani et al., 2000*).

Nei tessuti e nelle mucose le iDC catturano molecole proprie o estranee (*self o non-self*) all'organismo d'appartenenza. Le strategie utilizzate sono la fagocitosi, attraverso cui fanno *uptake* di corpi apoptotici, la macropinocitosi di fluidi extracellulari e l'endocitosi. Quest'ultima, in particolare, mediata da DEC205 e dal recettore del mannosio (MR), dirige il riconoscimento e

l'internalizzazione di strutture conservate presenti nei patogeni. Le iDC sono inoltre capaci di legare la porzione Fc (FcRs) delle immunoglobuline di tipo E (IgE) e G (IgG) formanti complessi immuni, nonché gli aggregati *heat-shock proteins* (gp96 e hsp70)-peptide (Théry & Amigorena, 2001).

Una volta catturato ed internalizzato, l'antigene proteico, *self* o *non-self*, viene processato. Il processamento consente di ottenere dei peptidi che verranno poi caricati su molecole del Maggiore Complesso di Istocompatibilità (MHC) ed esposti in superficie. L'immunità anti-microbica può essere indotta, inoltre, da componenti di natura non proteica (lipidi microbici e molecole glicolipidiche antigeniche), presentati in modo preferenziale dalle iDC in associazione a molecole CD1 (Cao et al., 2002).

In seguito all'interazione con prodotti microbici (LPS, DNA batterico e RNA a doppio filamento), spesso per mezzo dei recettori di membrana *Toll-like receptors* (TLRs) (Mellman & Steinman, 2001; Means et al., 2003), e/o stimoli infiammatori (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, e prostaglandine), le iDC

vanno poi incontro a maturazione. Questo è un processo continuo che inizia in periferia e termina nel linfonodo, dopo l'interazione CD40/CD40L-mediata con i linfociti T (*Banchereau et al., 2000*). Le mDC sono pressoché incapaci di fare *uptake* ma, al contrario, sono molto abili nella presentazione degli antigeni *non-self*, associati a MHC I/II, alle cellule T responsive. Il loro fenotipo, a differenza di quello delle iDC, è caratterizzato da un'alta espressione di tutte le molecole co-stimolatorie tra le quali CD40, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) e CD83, del CD25 (catena  $\alpha$  del recettore dell'IL-2), nonché da una elevata distribuzione sulla membrana dei complessi MHC I/II-peptide. La loro forma è stellata e consente a queste APC professionali di disporre di una grande superficie per legare meglio e con maggiore probabilità i *partners* di interazione (*Mellman & Steinman, 2001*). Le distinte popolazioni di DC attivate possono rilasciare, nell'ambiente circostante, diverse chemochine infiammatorie, implicate nel richiamo di altre cellule mononucleate del sistema immune nel sito d'infiammazione, citochine quali TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-7, IL-

15 e IL-12 (Hart, 1997), nonché IL-10 e IL-23. Il processo di maturazione generalmente impone anche cambiamenti nell'espressione, a livello della membrana, dei recettori per le chemochine (Sallusto et al., 1998). Ciò consente alle mDC di perdere la capacità di rispondere alle chemochine infiammatorie riconosciute da recettori come il CCR5, la cui espressione alla membrana si riduce con la maturazione, e di acquisire, per mezzo del CCR7, la sensibilità verso quelle prodotte negli organi linfoidi quali *secondary lymphoid tissue chemokine* (SLC) e CCL19.

Nelle *T cell areas* degli organi linfoidi, le DC attivate presentano l'antigene processato, in forma di complessi MHC-peptide, ai linfociti T *naive* responsivi. Questa presentazione, indispensabile per l'innescamento della risposta immune primaria e comunque per lo sviluppo dell'immunità acquisita (o specifica), richiede un contatto tra le cellule coinvolte che si esplica nella formazione della cosiddetta sinapsi immunologica (IS) (Grakoui et al., 1999). La struttura della sinapsi coinvolge, sulle DC, i complessi MHC-peptide, molecole d'adesione come DC-SIGN e la



l'*intercellular adhesion molecole* (ICAM)-1/2 nonché molecole di co-attivazione come B7-1 e B7-2. I linfociti T, al contrario, vedono impegnati i complessi *T cell receptor* (TCR)/CD3 (per il riconoscimento dell'antigene), molecole d'adesione come il *lymphocyte function-associated antigen* (LFA)-1 (ligando di ICAM-1 e ICAM-2) e ICAM-3 (ligando di DC-SIGN), molecole di co-attivazione come il CD28 (ligando di B7-1 e B7-2), il CD4 (ligando della porzione non polimorfica delle molecole MHC di classe II) o il CD8 (ligando della porzione non polimorfica delle molecole MHC di classe I), la fosfatasi CD45 (RA/RO). Inoltre, sia nelle DC che nei linfociti T vengono coinvolti anche vari componenti citoscheletrici (*Bromley et al., 2001; van der Merwe, 2002*).

Una volta *committed*, i linfociti T vanno incontro ad una rapida proliferazione, in risposta all'IL-2 da essi prodotta, e differenziano in cellule effettrici oppure in cellule della memoria (*memory*) capaci di rispondere prontamente ad una successiva restimolazione. Nel caso dei linfociti T CD4<sup>+</sup>, è possibile distinguere vari sottotipi di cellule effettrici, le *T helper 1*

(Th1), le Th2, le Th17 e le T regolatorie (Treg). Le Th1 producono IFN- $\gamma$  e LT- $\alpha$  richiesti per lo sviluppo di una risposta immune cellulo-mediata, antigene-specifica, le Th2 rilasciano IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, promovendo così l'attivazione delle cellule B e l'inizio della risposta umorale mentre le Th17, indotte ad espandersi dall'IL-23, secernono IL-17, responsabile dell'insorgenza di varie patologie a carattere infiammatorio.

Le DC sono anche le uniche APC in grado di convertire i linfociti T citotossici (CTLs) CD8<sup>+</sup> *naive* nei potenti effettori delle risposte citotossiche contro cellule infettate da virus o tumorali, e di indurre lo sviluppo di CD8<sup>+</sup> *memory*.

Oltre ad essere dei potenti stimolatori delle risposte immuni contro i patogeni, le DC sono anche degli induttori chiave per lo sviluppo della tolleranza centrale e periferica nei confronti degli antigeni *self*. La tolleranza centrale viene instaurata nel timo per mezzo di delezione clonale dei linfociti T *self*-reattivi dopo l'interazione con le DC presentanti antigeni *self*. Essa però risulta essere inefficace nell'impedire l'insorgenza di reazioni autoimmuni se non affiancata a quella periferica. Ciò è

dovuto al fatto che non tutti gli antigeni self possono raggiungere il timo e che alcuni linfociti *self*-reattivi sfuggono alla delezione centrale. La tolleranza periferica invece viene avviata in seguito all'intervento di DC definite *immunologic-self*, le quali, nello *steady state*, in assenza di stimoli infiammatori, entrano nei linfonodi regionali, nello stato "immaturo" o "semi-maturo", dove presentano gli antigeni *self* raccolti in periferia. La delezione dei linfociti T *self*-reattivi può avvenire direttamente, per induzione di apoptosi o di anergia da parte delle DC tolerogeniche, o indirettamente, mediante l'induzione di cellule T regolatorie antigene-specifiche. A tutt'oggi, purtroppo, non è ancora noto, con esattezza, cos'è che spinge le DC a scegliere tra immunità e tolleranza, ma indubbiamente, la presenza o assenza di infiammazione e il loro stato di maturazione, giocano un ruolo importante (*Steinman et al., 2003*).

In virtù quindi della peculiare capacità delle DC di regolare la risposta immunitaria e di servire come collegamento tra l'immunità innata e quella acquisita, un'intensa attività di ricerca

ha come scopo l'utilizzo di queste cellule come adiuvanti naturali per interventi terapeutici e/o vaccinali per diverse patologie, quali reazioni di rigetto post-trapianto, malattie autoimmuni, infettive e neoplastiche. L'obiettivo finale è quello di mettere a punto protocolli di immunoterapia in cui le DC svolgano un ruolo critico nel determinare la quantità e la qualità della risposta immune all'antigene.

Ontogenesi: macrofago o DC ?

Studi sull'ontogenesi dei macrofagi e delle DC mieloidi hanno dimostrato come queste due popolazioni del sistema immune derivino da un comune precursore monocitario capace di differenziare in entrambi i tipi cellulari, a seconda dei segnali impartiti da citochine presenti a livello tissutale. (*Inaba et al., 1993*). A tal riguardo, è stato descritto che monociti umani o murini ma anche pre-immunociti di topo possono differenziare *in vitro* in macrofagi o DC, a seconda del *cocktail* di citochine utilizzato (*Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Geissmann et al., 1998; Schreurs et al., 1999; Bruno et al., 2001*), e che monociti murini del sangue periferico possono differenziare *in vivo* in un particolare *subset* di DC sotto specifiche condizioni infiammatorie (*Randolph et al., 1999; Geissmann et al., 2003*). Recentemente, inoltre, è stato anche isolato e descritto un progenitore murino del midollo osseo, specifico per monociti, diversi *subsets* macrofagici e DC spleniche residenti (*Fogg et al., 2006*). Nonostante ciò comunque ancora poco si sa circa i fattori regolatori e i meccanismi che controllano il

differenziamento di monociti in DC o macrofagi. Il *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), ad esempio, è stato descritto come un fattore capace di dirigere il differenziamento sia di macrofagi che di DC, da solo o in combinazione con altri fattori di crescita o citochine (Akagawa *et al.*, 2006; Zou & Tam., 2002). Il GM-CSF, inoltre, contribuisce a ridurre l'espressione del recettore del *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) su monociti, inibendo così il loro differenziamento in macrofagi guidato da M-CSF (Suzuki *et al.*, 2004).

### Caratteristiche del GM-CSF

Il GM-CSF è stato inizialmente identificato sulla base della sua capacità di stimolare la proliferazione clonale di precursori mieloidi *in vitro* (Metcalf *et al.*, 1986), e sulla base della sua abilità di stimolare neutrofili, monociti/macrofagi e la formazione di colonie di eosinofili (Gasson, 1991). Ad oggi, comunque, gli sono stati attribuiti numerosi altri effetti biologici, inclusi la regolazione della sopravvivenza, il differenziamento e l'attivazione di cellule effettrici mature, implicate nella presentazione dell'antigene e nell'immunità cellulo-mediata (Fleetwood *et al.*, 2005), come anche l'induzione di proliferazione di linee cellulari tumorali tra le quali quelle di sarcoma osteogenico, carcinoma e adenocarcinoma. Questa citochina è prodotta da diversi tipi cellulari inclusi linfociti T, macrofagi, cheratinociti e cellule endoteliali, dopo attivazione indotta da infiammazione (Sallerfors., 1994) oppure da mastcellule, in seguito all'esposizione all'allergene (Shakoory *et al.*, 2004) ma anche da cellule tumorali, in modo costitutivo (Oster *et al.*, 1989). Livelli aumentati di GM-CSF,

inoltre, sono stati trovati negli estratti di scaglie psoriatiche (*Takematsu & Tagami, 1990*), nel sangue periferico di pazienti con asma bronchiale (*Nakamura et al., 1993*) e nel siero di pazienti affetti da cancro al polmone (*Sawyers et al., 1992*) o leucemia mielogeno acuta (*Omori et al., 1992*).

Il GM-CSF è una classica citochina pleiotropica che regola molteplici attività biologiche attraverso l'attivazione di recettori eterodimerici costituiti da una subunità  $\alpha$ , che lega direttamente la citochina e da una catena  $\beta$  che è responsabile della trasduzione del segnale (*Guthridge et al., 1998*). Recentemente, è stato dimostrato che la pleiotropia del GM-CSF è controllata da un motivo tirosina/serina sul recettore del GM-CSF (GM-CSFR) che agirebbe come un interruttore binario, a seconda della concentrazione della citochina (*Guthridge et al., 2006*).



## **- Scopo del Lavoro -**

Nonostante sia noto, già da diversi anni, che le cellule dendritiche e i macrofagi evolvono da un precursore monocitario comune (*Inaba et al., 1993*) poco ancora si sa riguardo i fattori regolatori e i meccanismi che controllano tale differenziamento. Nell'uomo, il GM-CSF è considerato un fattore di sopravvivenza critico sia per il differenziamento di monociti a macrofagi che per la generazione *in vitro* di DC mieloidi, ed è stato sempre utilizzato in combinazione con altre citochine, tra le quali IL-4 (*Sallusto & Lanzavecchia, 1994*) e interferone di tipo I (IFN I) (*Santini et al., 2000*), per differenziare monociti del sangue periferico in *monocyte-derived* DC (MDDC) (*Zou & Tam, 2002*). Al contrario, nel topo questo fattore è di per sè sufficiente a indurre il differenziamento a DC (*Lu et al., 1995; Masurier et al., 1999; Inaba et al., 1992*).

Alla luce di queste evidenze, il nostro obiettivo è stato quello di comprendere se il GM-CSF potesse essere considerato anche nell'uomo un diretto protagonista, più che un semplice fattore di sopravvivenza, nella generazione di DC mieloidi, e se la

espressione del recettore del GM-CSF (GM-CSFR) sui monociti precursori potesse avere un ruolo in questo fenomeno.

A tale scopo monociti isolati dal sangue periferico di donatori sani, caratterizzati per l'espressione del GM-CSF R, sono stati coltivati in vitro 5-6 giorni in presenza di solo GM-CSF. Le cellule così ottenute sono poi state analizzate per le loro caratteristiche fenotipiche e funzionali, quali l'espressione di molecole di superficie, la capacità di rispondere ai ligandi dei diversi *toll-like receptor* (TLR), di migrare in risposta a chemochine inducibili o costitutive, di catturare l'antigene, di indurre proliferazione di linfociti T allogenici e di produrre citochine e chemochine.

## **- Materiali e Metodi -**

### Generazione in vitro delle DC e dei macrofagi

Le cellule dendritiche sono state generate a partire da monociti umani isolati dal sangue periferico di donatori sani, in presenza di GM-CSF da solo o GM-CSF e IL-4 (IL-4 DC).

In breve, come mostrato in Figura 1, sono stati dapprima isolati i *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) mediante centrifugazione su gradiente di *Ficoll*, che sfrutta le differenti densità delle cellule mononucleate rispetto agli altri componenti ematici (Gessani et al., 2000). Dai PBMC sono poi stati ottenuti i monociti, mediante *counterflow centrifugal elutriation*, che si avvale della differente velocità di sedimentazione delle popolazioni cellulari con diverso volume (Gessani et al., 2000). I monociti elutriati sono stati quindi ulteriormente purificati mediante selezione negativa con biglie immunomagnetiche (Miltenyi Biotec), che prevede la rimozione delle eventuali popolazioni cellulari contaminanti attraverso l'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro CD3, CD7, CD16, CD19,

CD56, CD123 e glicoforina A. Infine, i monociti così ottenuti, puri al 99% sono stati risospesi in terreno RPMI 1640 (BioWhittaker) contenente 2 mM L-glutammina, 2 mM penicillina/streptomicina e 10% *fetal bovine serum* (FBS, Hyclone) scomplementato e filtrato, alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/ml. Le cellule sono poi state seminate in piastre da 6 pozzetti (Falcon) e tenute in incubatore per cinque/sei giorni, in presenza di GM-CSF (50 ng/ml, Shering Plough) e IL-4 (500 U/ml, Shering Plough) oppure GM-CSF da solo (aggiungendo terreno fresco e citochine al giorno 3). Alcune colture sono poi state stimulate a maturare mediante aggiunta di LPS da *Escherichia Coli* (200 ng/ml, Sigma Aldrich), poly I-C (20 µg/ml) oppure R848 (2 µg/ml) per 48 ore. In alcuni esperimenti l'LPS è stato aggiunto in presenza di anticorpi neutralizzanti anti-IL-10 o IgG2b di controllo (5 µg/ml, R&D System).

### Analisi fenotipica

L'analisi fenotipica delle cellule generate con GM-CSF da solo o con GM-CSF e IL-4 è stata effettuata mediante citofluorimetria. Questa procedura prevede dapprima la marcatura delle cellule con anticorpi specifici coniugati ad un fluorocromo e successivamente la lettura e l'elaborazione dei dati al *Fluorescence-Activated Cell Sorter* (FACS).

In breve, le cellule sono state lavate con PBS, pre-incubate per trenta minuti in ghiaccio con PBS contenente il 10% di siero umano AB (per minimizzare la formazione di legami aspecifici tra la regione costante Fc degli anticorpi utilizzati e gli *Fc receptors* espressi sulle DC) e successivamente incubate per altri trenta minuti in ghiaccio con anticorpi IgG2a anti-CD14, CD71, CD1a, CD80, CD86, CD40, CD83, HLA-DR, HLA ABC e CCR5 o IgG1 anti-CD25, tutti coniugati al fluorocromo FITC, oppure con immunoglobuline IgG2a anti-*mannose receptor* (MR), coniugate al fluorocromo PE (BD Biosciences). Le cellule sono poi state lavate, risospese in PBS, e analizzate al

citofluorimetro (FACS, Becton-Dickinson). La fluorescenza non specifica rivelata dal legame degli isotipi di controllo è stata sottratta.

Per l'analisi del DC-SIGN è stata fatta invece una marcatura con anticorpi non coniugati diretti contro il DC-SIGN per trenta minuti, seguita da un'ulteriore incubazione con IgG, coniugate al fluorocromo PE, dirette contro il primo anticorpo (BD Biosciences).

Infine, sempre mediante citofluorimetria, è stata analizzata anche l'espressione di entrambe le catene  $\alpha$  e  $\beta$  del GM-CSFR sui monociti appena isolati, sui PBMC e sul sangue intero. Per la catena  $\alpha$  (GM-CSFR $\alpha$ ) sono stati utilizzati anticorpi IgM anti-CD116 (GM-CSFR $\alpha$ ), coniugati al fluorocromo FITC (BD Biosciences), mentre l'espressione della catena  $\beta$  è stata saggiata attraverso una prima marcatura delle cellule con anticorpi specifici per questa subunità, seguita da una seconda marcatura con IgG coniugate a biotina, dirette contro il primo anticorpo e successivamente un'incubazione, sempre della durata di trenta

minuti, con streptavidina coniugata al fluorocromo FITC (BD Biosciences).

### *Saggio di cattura dell'antigene*

Il saggio di *uptake* dell'antigene valuta la capacità tipica delle cellule presentanti l'antigene professionali (APC) di inglobare macromolecole legate ad un tracciante fluorescente (FITC), la cui presenza all'interno delle cellule può essere rilevata e quantificata mediante analisi al FACS.

Le cellule generate con GM-CSF da solo o con GM-CSF e IL-4 sono state analizzate da immature o dopo 48 ore di stimolazione con LPS, che ne induce la maturazione. In particolare, sono state lavate con PBS, pre-incubate per trenta minuti in ghiaccio con PBS contenente il 10% di siero umano AB e poi per quaranta minuti a 37°C con destrano-FITC 70000 MW (Molecular Probes; 0,05 mg/ml). La concentrazione di destrano-FITC e il tempo di incubazione sono stati precedentemente stabiliti mediante prove su IL-4 DC immature. Alcune colture sono state incubate con destrano-FITC a 0°C come controlli negativi. Dopo due lavaggi con PBS le cellule sono state risospese in PBS e analizzate al citofluorimetro.



### *Saggio di chemiotassi*

Il saggio di chemiotassi consente di valutare, *in vitro*, la capacità delle cellule di migrare in risposta a stimoli derivati da chemochine inducibili o costitutive.

La migrazione è stata saggiata in apposite piastre per colture cellulari da 24 pozzetti, ciascuno dei quali costituito da una camera suddivisa in due compartimenti da una membrana con pori di 8  $\mu\text{m}$  che consente il passaggio delle cellule migranti (Costar, NY).

Brevemente, a cinque giorni dalla semina dei monociti,  $5 \times 10^5$  cellule generate con GM-CSF da solo o GM-CSF e IL-4, stimulate con LPS e non, sono state lavate, risospese in terreno senza siero e caricate nei compartimenti superiori delle camere. Le chemochine CCL4 o CCL19 (0.5 mg/ml; Peprotech) sono poi state aggiunte nei compartimenti inferiori. Dopo due ore di incubazione a 37°C le cellule che hanno migrato nei compartimenti inferiori, in risposta al gradiente chemiotattico sono state raccolte e contate. Il numero ottenuto è stato

considerato come indice per valutare l'entità di migrazione delle cellule.

### *Saggio della Reazione Leucocitaria Mista*

Il saggio della reazione leucocitaria mista (MLR) consente di stimare il grado di attivazione funzionale delle APC mediante valutazione del tasso di proliferazione di linfociti (PBL) allogenici in risposta alle molecole del Maggiore Complesso di Istocompatibilità espresse sulle APC stesse.

Dopo cinque giorni di coltura le cellule generate con GM-CSF da solo o GM-CSF e IL-4, stimulate con LPS e non, sono state lavate, contate e risospese in RPMI 1640 contenente il 5% di siero umano AB scomplementato. Le cellule sono state cocoltivate con i PBL allogenici (precedentemente risospesi nello stesso terreno), in triplicato, in piastre da 96 pozzetti (Falcon), nei rapporti DC/PBL 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100, e tenute a 37°C per cinque giorni. Durante le ultime 16 ore, le colture miste sono state pulsate con 0.5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -timidina (attività specifica 5 Ci/mole, Amersham) e i linfociti marcati (responsivi) sono stati contati al  $\beta$ -counter. L'entità della loro proliferazione è stata valutata in base alla quantità di timidina incorporata. La timidina triziata è stata aggiunta anche a colture singole di DC o PBL, per

controllarne l'incorporazione aspecifica (*Conti et al., 2005*).

### *Saggio di proliferazione delle cellule T con CFSE*

Il saggio di proliferazione delle cellule T mediante marcatura con CFSE, un intercalante del DNA che viene incorporato dai linfociti e successivamente diluito durante la proliferazione, consente di caratterizzare le sottopopolazioni di linfociti indotte a proliferare dalle APC.

Le cellule generate con GM-CSF da solo sono state quindi co-coltivate con PBL precedentemente marcati con 5  $\mu$ M di CFSE (Vybrant<sup>TM</sup> CFDA-SE Cell tracer kit; Molecular Probes).

In breve, i PBL sono stati marcati con CFSE per quattro minuti a temperatura ambiente, lavati due volte, risospesi in RPMI contenente 5% di siero umano AB alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/ml e infine seminati, da soli o in presenza delle cellule differenziate con GM-CSF, nel rapporto 10:1. Dopo cinque/otto giorni di co-coltura i linfociti sono stati raccolti, doppiamente marcati con anticorpi coniugati al fluorocromo PE anti-CD4 o anti-CD8 e anticorpi coniugati al fluorocromo PerCP anti-CD3 (BD Biosciences) e analizzati al citofluorimetro. I linfociti

marcati con CFSE sono stati anche analizzati per l'espressione del TCR $\gamma\delta$  o del CD56 usando anticorpi specifici coniugati al fluorocromo PE (BD Biosciences).

### *Determinazione dei livelli di citochine e chemochine*

I sopranatanti raccolti a *day* 5 dalle colture di cellule generate con solo GM-CSF o con GM-CSF e IL-4, stimulate con LPS e non, sono stati analizzati per la presenza di IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$  (R&D Systems), IL-23 (Bender MedSystems), IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (Pierce), mediante saggi immunoenzimatici ELISA. Questi prevedono una prima incubazione dei campioni da analizzare su apposite piastre adsorbite con anticorpi specifici per un epitopo della citochina da rilevare, seguita da una seconda incubazione con anticorpi diretti contro un altro epitopo della stessa citochina. Questi ultimi sono coniugati ad un enzima, la perossidasi, capace di sviluppare una reazione colorimetrica, la cui intensità è proporzionale alla quantità di citochina presente nei sopranatanti. I livelli di citochine rilasciati sono stati espressi in pg/ml.

La presenza delle chemochine CCL1 e CCL2 nei sopranatanti è stata misurata usando il SearchLight kit per chemochine (Endogen), mentre quella di CCL3 e CCL4 è stata saggiata mediante appositi kit ELISA (R&D Systems), con la stessa

procedura descritta per le citochine di cui sopra.

Infine, sempre mediante saggi ELISA, è stata anche analizzata la presenza di IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 (R&D System) nei soprannatanti delle colture miste descritte sopra.



## - Risultati -

### *I monociti del sangue periferico presentano una variabilità, dipendente dal donatore, nella densità di superficie della subunità $\alpha$ del GM-CSFR*

Il GM-CSF regola molteplici attività biologiche interagendo con recettori eterodimerici costituiti da una subunità  $\alpha$  (GM-CSFR $\alpha$ ) e una  $\beta$  (GM-CSFR $\beta$ ). Nel nostro lavoro abbiamo voluto verificare se l'espressione del GM-CSFR sui monociti precursori potesse influenzare la capacità di questi ultimi di differenziare verso macrofagi o DC in presenza di GM-CSF. Abbiamo quindi dapprima analizzato, mediante citofluorimetria, l'espressione del GM-CSFR in monociti appena isolati dal sangue periferico di 20 differenti donatori sani. Come mostrato in Figura 2, i monociti ottenuti dalla maggior parte dei donatori (18 su 20) esprimono il GM-CSFR $\alpha$  sulla loro superficie cellulare. Sebbene però quasi il 100% delle cellule esprime la subunità  $\alpha$ , la densità di superficie di questa catena varia in modo considerevole tra i donatori analizzati. Sulla base quindi dei valori di *median fluorescence intensity* (MFI), abbiamo definito tre differenti fenotipi (Tabella

1): GM-CSFR<sup>bright++</sup> che rappresenta il 45% dei donatori, GM-CSFR<sup>bright+</sup> che rappresenta il 25% dei donatori, e GM-CSFR<sup>dim+</sup> che rappresenta il 20% dei donatori. Nel restante 10% dei donatori (2 su 20), invece, solo una piccola percentuale di monociti (10-12%) esprime la catena  $\alpha$  del GM-CSFR per altro, ad una densità di superficie molto bassa (GM-CSFR<sup>dim++</sup>). I livelli d'espressione del GM-CSFR $\alpha$  da noi osservati, inoltre, non dipendono dalla procedura di preparazione dei monociti. Lo stesso profilo d'espressione e di densità di superficie è stato infatti trovato, per ciascuna tipologia di donatore, nella frazione monocitaria prima e dopo la purificazione dal sangue intero o dai PBMC totali (Figura 3) come pure nei monociti isolati mediante elutriazione o selezione positiva utilizzando anticorpi anti-CD14 (Miltenyi Biotec) (Figura 3).

Al contrario di quanto osservato per la subunità  $\alpha$ , l'espressione della catena  $\beta$  non varia in modo significativo tra i donatori e livelli molto bassi di questa subunità sono stati trovati nei monociti di tutti i donatori analizzati, indipendentemente dall'espressione del GM-CSFR $\alpha$  (dati non mostrati).

*I livelli di espressione del GM-CSFR $\alpha$  nei monociti correlano con la loro capacità di differenziare in macrofagi o DC in risposta al GM-CSF*

Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo quindi verificato se la variabilità osservata nell'espressione (in termini di MFI) del GM-CSFR $\alpha$  in monociti da diversi donatori, potesse in qualche modo riflettere una differente capacità di queste cellule a differenziare in DC. A tale scopo, monociti isolati da donatori esprimenti GM-CSFR $\alpha$  a differente densità, sono stati coltivati con GM-CSF e IL-4, il cocktail più usato per la generazione *in vitro* di DC mieloidi (Sallusto & Lanzavecchia, 1994) e, dopo cinque/sei giorni, la proporzione di DC ottenute è stata misurata sia come percentuale di cellule CD14<sup>-</sup>CD1a<sup>+</sup> sia come presenza di cellule non aderenti con morfologia DC-like. Come mostrato in Tabella 1, indipendentemente dall'espressione della catena  $\alpha$  del GM-CSFR, più del 50% dei monociti definiti come GM-CSFR $^{bright++}$ ,  $^{bright+}$  e  $^{dim+}$ , è stato in grado di differenziare in cellule CD14<sup>-</sup>CD1a<sup>+</sup>. Inoltre, la maggior parte di queste

non ha aderito alla plastica, esibendo morfologia e fenotipo delle DC immature “classiche”. Al contrario, solo il 20% circa dei monociti isolati dai due donatori GM-CSFR $dim++$  ha acquisito l’espressione del CD1a (Tabella 1), suggerendo che solo una percentuale molto bassa di monociti esprimenti GM-CSFR $\alpha$ , associata a una bassa densità di superficie a livello di singola cellula, può interferire con la generazione di DC indotta da GM-CSF e IL-4. Il grado di mortalità cellulare osservato nelle colture di cinque giorni è stato di circa il 30-40%, indipendentemente dai donatori analizzati.

I monociti del sangue periferico umano, coltivati *in vitro* in assenza di fattori di crescita, differenziano spontaneamente in macrofagi CD14 $^+$ CD71 $^+$  (Gessani *et al.*, 1993). Poiché però una significativa proporzione di cellule va incontro a morte, il GM-CSF viene usato per incrementare la sopravvivenza dei monociti, favorendone il differenziamento in macrofagi (Akagawa *et al.*, 2006). Alla luce di queste evidenze, per meglio indagare sul ruolo dell’espressione del GM-CSFR $\alpha$  nelle risposte dei monociti al GM-CSF, questi ultimi sono stati coltivati per cinque

giorni con GM-CSF da solo e analizzati per la presenza di *markers* di superficie specifici per macrofagi o DC. In particolare, abbiamo concentrato l'attenzione sull'espressione del CD14 del CD71 come *marker* di riferimento per il differenziamento macrofagico, e del CD1a come *marker* di riferimento per il differenziamento di DC. Così facendo, abbiamo trovato che, nonostante la maggior parte delle cellule ricavate da queste colture mantiene l'espressione del CD14, esiste una correlazione tra la densità di superficie della subunità  $\alpha$  del GM-CSFR sui monociti precursori e la proporzione di cellule macrofago-*like* CD71<sup>+</sup> o DC-*like* CD1a<sup>+</sup> che può essere ottenuta in presenza del solo GM-CSF (Tabella 1). In particolare, abbiamo visto che una più alta densità di espressione alla superficie cellulare del GM-CSFR $\alpha$  è associata ad un più alto rapporto di cellule CD1a<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>. Al contrario, più del 50% dei monociti isolati dai due donatori GM-CSFR $dim^{++}$  ha aderito alla plastica, differenziando in macrofagi CD14<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>, e solo una piccola percentuale ha acquisito l'espressione del CD1a (Tabella 1). Il grado di mortalità cellulare è risultato

paragonabile a quello osservato nelle colture di monociti trattate con GM-CSF e IL-4 (30-40%). Questi risultati suggeriscono che, al contrario di quanto osservato per le DC generate con GM-CSF e IL-4, un'alta densità del GM-CSFR $\alpha$  è richiesta per il differenziamento dei monociti in cellule DC-like CD1a<sup>+</sup> in risposta al GM-CSF, quando aggiunto da solo, mentre bassi livelli di espressione del GM-CSFR $\alpha$  favoriscono il differenziamento in macrofagi.

Le cellule CD1a<sup>+</sup> generate dalle colture di monociti trattate con GM-CSF presentano caratteristiche fenotipiche proprie delle DC immature

Le cellule DC-like CD1a<sup>+</sup> non aderenti ottenute dai monociti coltivati con GM-CSF, sono state dapprima caratterizzate mediante una dettagliata analisi fenotipica. Le MDDC “classiche”, differenziate in presenza di GM-CSF e IL-4, sono state usate come controlli. Come mostrato in Figura 4, le cellule generate con solo GM-CSF esprimono livelli considerevoli delle molecole costimolatorie CD80 e CD40, maggiori di quelli osservati nelle IL-4 DC e, come quest’ultime, bassi livelli di CD86, antigeni MHC di classe I e II e CCR5. Al contrario delle IL-4 DC, però, esse mantengono l’espressione del CD14 (Figura 4), sebbene il valore di MFI di questo *marker* sia risultato circa tre volte più basso di quello osservato in macrofagi CD71<sup>+</sup> (dati non mostrati). Inoltre, come le classiche MDDC, le cellule CD1a<sup>+</sup> generate sotto le nostre condizioni sperimentali non sono risultate esprimere il CD83 e il CD25 allo stadio immaturo.

Queste caratteristiche, insieme alla morfologia irregolare propria

delle cellule dendritiche (dati non mostrati), hanno indicato che il GM-CSF da solo può indurre il differenziamento di cellule con caratteristiche fenotipiche simili a quelle delle MDSC immature “classiche” (Sallusto & Lanzavecchia, 1994).

Sebbene il profilo fenotipico mostrato in Figura 4 sia stato ottenuto in cellule generate da colture di monociti GM-CSFR<sup>bright++</sup>, dalle quali abbiamo potuto ottenere più del 90% di cellule DC-like (Tabella 1), cellule con le stesse caratteristiche sono state comunque differenziate, in proporzioni diverse, da colture di monociti isolati da tutti i donatori analizzati.

Al contrario, le cellule CD71<sup>+</sup>, ottenute in numero consistente dai donatori esprimenti bassi livelli di GM-CSFR $\alpha$ , esibiscono una chiara morfologia macrofagica, sono CD1a<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>CD11a<sup>+</sup> e esprimono livelli degli antigeni MHC di classe I e II paragonabili a quelli presentati dalle DC CD1a<sup>+</sup>, ma bassissimi livelli delle molecole costimolatorie (dati non mostrati).



Le DC generate con GM-CSF vanno incontro a maturazione fenotipica in seguito a stimolazione dei TLRs

Dopo aver verificato che le cellule CD1a<sup>+</sup> ottenute da monociti trattati con GM-CSF (GM-DC) presentano caratteristiche fenotipiche molto simili a quelle delle classiche IL-4 DC immature (IL-4 iDC), abbiamo analizzato se queste stesse cellule fossero anche in grado di maturare in risposta alla stimolazione dei TLRs. Così le GM-DC sono state stimolate per 48 ore con LPS, ligando del TLR4, e successivamente analizzate per l'espressione dei *markers* fenotipici propri delle DC mature (mDC). Come mostrato in Figura 4, dopo la stimolazione con LPS, l'espressione del CD14 diminuisce marcatamente parallelamente ad un considerevole aumento del CD80, CD40, CD86 e degli antigeni MHC di classe I e II. La stimolazione con LPS determina inoltre una buona induzione dei marcatori di maturazione CD83 e CD25, mentre il CCR5 è ridotto in modo significativo (Figura 4). Pertanto, il profilo fenotipico delle GM-DC stimolate con LPS somiglia fortemente a quello delle IL-4

DC mature (Figura 4).

Le GM-DC sono poi state anche stimolate con poli I:C (Sigma), ligando del TLR3 o con R848 (gentilmente fornitoci dall'IRBM, Pomezia, Italia), ligando del TLR8. Come mostrato in Figura 5, un' aumento significativo dell'espressione del CD86 e delle molecole MHC di classe II, come pure l'induzione di CD83 sono state osservate nelle GM-DC in risposta a entrambi gli stimoli, a livelli paragonabili a quelli delle IL-4 DC. Questi risultati indicano che le GM-DC non solo esprimono il TLR3 e il TLR8, oltre al TLR4, ma sono anche in grado di andare incontro a maturazione dopo la stimolazione di questi stessi recettori.

E' noto da tempo che l'abilità di catturare l'antigene è un'importante caratteristica delle DC allo stadio immaturo e che diminuisce in seguito a maturazione (*Lipscomb & Masten, 2002*). Le GM-DC sono state quindi analizzate per la capacità di catturare l'antigene, prima e dopo stimolazione con LPS, così come per l'espressione delle "C-type lectins" coinvolte in questo processo. Come mostrato in Figura 6A, queste cellule esprimono il recettore del mannosio (MR) e il DC-SIGN, due recettori

implicati nell'*uptake* dell'antigene, ed esibiscono una buona capacità endocitica allo stadio immaturo, marcatamente ridotta dopo induzione di maturazione con LPS (Figura 6B).

*Le GM-DC sono in grado di migrare in risposta alle chemochine CCL4 e CCL19*

È ben noto che le DC sono in grado di migrare in risposta a stimoli chemiotattici derivati da chemochine che vengono riconosciute attraverso specifici recettori di membrana, espressi dalle DC in modo differente a seconda del loro stato di attivazione (*Caux et al., 2000*). In particolare, le DC immature rispondono a chemochine inducibili o infiammatorie, mentre, in seguito a maturazione, acquisiscono la capacità di migrare verso le chemochine omeostatiche o costitutive.

Poichè le GM-DC immature (GM-iDC) esprimono il CCR5 (Figura 4), abbiamo verificato se queste cellule fossero in grado di migrare in risposta al suo ligando, la CCL4. I risultati ottenuti hanno chiaramente dimostrato che le GM-iDC migrano in risposta alla CCL4 allo stesso modo delle IL-4 iDC e, come atteso, questa loro capacità diminuisce fortemente dopo maturazione indotta da LPS (Tabella 2). Abbiamo poi analizzato l'espressione del CCR7 e la risposta chemiotattica al suo ligando CCL19, osservando che le GM-DC migrano anche in risposta

alla CCL19, indipendentemente dal loro stato di maturazione. Al contrario, le classiche IL-4 DC, come atteso (*Lipscomb & Masten, 2002*), acquisiscono questa caratteristica solo dopo maturazione indotta da LPS (Tabella 2).

Allo scopo di comprendere a cosa siano dovuti il fenotipo parzialmente attivato delle GM-DC e la loro migrazione costitutiva, abbiamo verificato se fattori inducenti maturazione, come il TNF- $\alpha$ , l'interferone di tipo I e la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), potessero essere rilasciati dai monociti trattati con solo GM-CSF e in ultimo essere implicati. Così abbiamo utilizzato anticorpi neutralizzanti (TNF- $\alpha$ , interferone) o inibitori specifici (indometacina per PGE<sub>2</sub>) per bloccare l'attività biologica di questi fattori ma, non avendo riscontrato alcuna variazione nel fenotipo delle GM-DC, abbiamo escluso l'ipotesi sopra descritta (dati non mostrati).

Le GM-DC inducono l'espansione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e produzione di IFN- $\gamma$

Dopo aver analizzato le caratteristiche fenotipiche e migratorie delle GM-DC abbiamo indagato sulla loro capacità di stimolare la proliferazione di linfociti allogenici e di indurre produzione di citochine. Come mostrato in Figura 7A, le GM-iDC possiedono un'alta capacità allostimolatoria, a tutti i rapporti PBL/DC. Questa però, contrariamente a quanto riscontrato nelle IL-4 DC in accordo a precedenti osservazioni (*Sallusto & Lanzavecchia, 1994*), non aumenta dopo stimolazione con LPS (Figura 7A).

Per meglio caratterizzare le sottopopolazioni di linfociti espanse dalle GM-DC nelle reazioni leucocitarie miste, i linfociti allogenici totali marcati con CFSE sono stati seminati con iDC o mDC. A cinque/otto giorni di co-coltura i linfociti proliferanti sono stati quindi analizzati per l'espressione degli antigeni CD4 e CD8 mediante citofluorimetria. Come mostrato in Figura 7B, le GM-DC immature e mature espandono sia i linfociti T CD4<sup>+</sup> che i CD8<sup>+</sup>.

Infine, riguardo la capacità di indurre produzione di citochine nei linfociti allogenici, le GM-iDC, al contrario delle IL-4 iDC, stimolano una notevole produzione di IFN- $\gamma$  ( $1044.4 \pm 110.3$  pg/ml indotti dalle GM-iDC vs  $161.2 \pm 21.3$  pg/ml indotti dalle IL-4 iDC), solo modestamente incrementata dopo stimolazione con LPS ( $1929.7 \pm 167.2$  pg/ml indotti dalle GM-DC vs  $734.2 \pm 132.5$  pg/ml indotti dalle IL-4 DC). Nessuna secrezione di IL-4 e IL-10 invece è stata indotta nelle colture miste, indipendentemente dal tipo e dallo stato di maturazione delle DC utilizzate (dati non mostrati).

Questi risultati suggeriscono che le GM-DC sono in grado di polarizzare i linfociti T verso una risposta di tipo T helper (Th) 1.

Le GM-DC secernono costitutivamente la CCL1 e producono citochine e chemochine infiammatorie, dopo maturazione

Le GM-DC immature e quelle stimulate con LPS sono state analizzate anche per la produzione di diverse CC chemochine e citochine. Come mostrato in Figura 8A, contrariamente alle IL-4 DC, le GM-iDC secernono in modo costitutivo considerevoli quantità di CCL1, la cui produzione però non aumenta dopo stimolazione con LPS. Le chemochine CCL2, CCL3 e CCL4, invece, rilasciate in basse quantità da entrambi i tipi di DC allo stato immaturo, sono prodotte dalle stesse cellule in alte quantità dopo maturazione indotta da LPS (Figura 8A). Allo stesso modo il trattamento con LPS induce produzione di alti livelli di TNF- $\alpha$  (Figura 8B).

E' stato dimostrato che l'IL-4 induce le DC generate in sua presenza a produrre, dopo esposizione a stimoli maturativi, citochine innescanti risposte di tipo Th1, quali l'IL-12 (Hochrein et al., 2000; Ebner et al., 2001; Yao et al., 2005). Al contrario, le

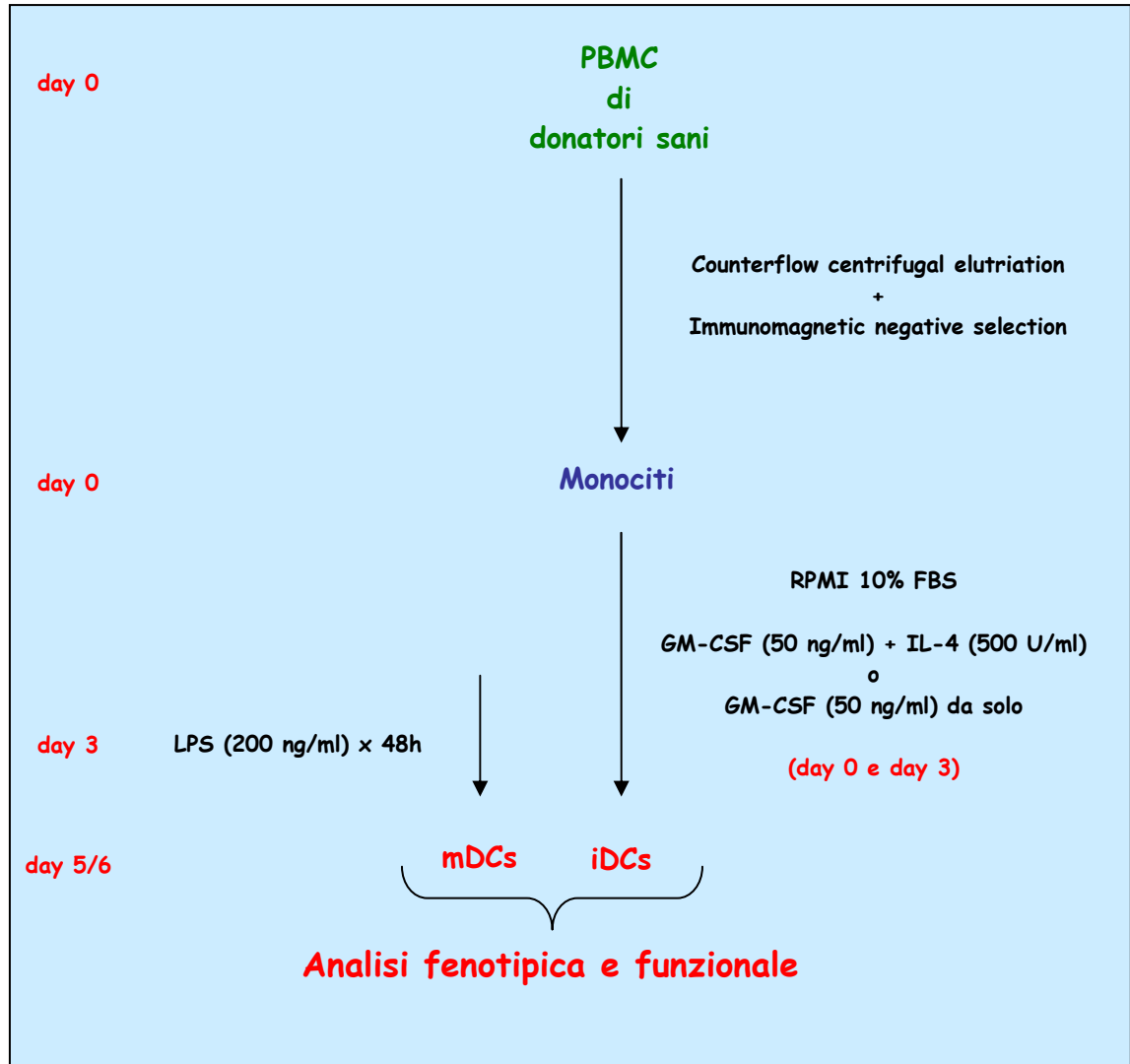


GM-DC stimulate con LPS, producono basse quantità di IL-12 e alti livelli di IL-10 (Figura 8B). Tenendo conto del fatto che le GM-DC possiedono una buona capacità allostimolatoria già allo stato immaturo (Figura 7), ci siamo chiesti se questi bassi livelli di IL-12 potessero di per se essere sufficienti ad indurre una considerevole proliferazione di cellule T, oppure se altri membri della famiglia dell'IL-12 fossero implicati. Quindi abbiamo indagato se le GM-DC fossero capaci di produrre l'IL-23, membro della famiglia dell'IL-12. I dati ottenuti però hanno chiaramente dimostrato che le GM-DC, come le IL-4 DC, sono in grado di produrre l'IL-23 solo dopo maturazione indotta da LPS e non allo stato immaturo (Figura 8B).

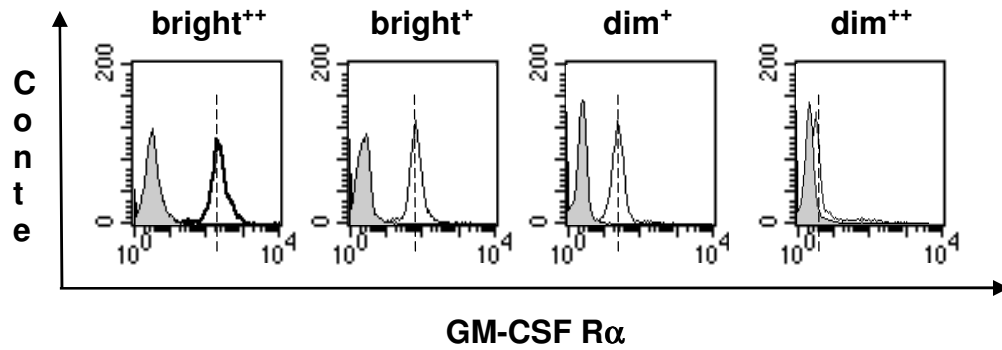
*La neutralizzazione dell'IL-10 prodotta dalle GM-DC stimulate con LPS induce in queste cellule produzione di IL-12 e ne incrementa l'attività allostimolatoria.*

Sulla base dei risultati ottenuti indicanti che le GM-DC producono poca IL-12 ma alti livelli di IL-10 (Figura 8B), e che la loro già alta attività immunomodulatoria non è ulteriormente aumentata dalla maturazione (Figura 7A) abbiamo indagato se la produzione endogena di IL-10 potesse in qualche modo ostacolare il raggiungimento da parte delle GM-DC di una completa maturazione funzionale. Quindi le GM-DC sono state stimulate con LPS in presenza o in assenza di anticorpi neutralizzanti l'IL-10 e successivamente analizzate per la produzione di citochine come pure per la capacità di stimolare la proliferazione di cellule T e la produzione di IFN- $\gamma$ . Come mostrato in Figura 9A, le GM-DC maturate con LPS in presenza di anticorpi anti-IL-10, contrariamente a quelle non trattate o trattate con anticorpi di controllo, producono alti livelli di IL-12. Invece, come atteso dalla scarsa capacità di produrre IL-10

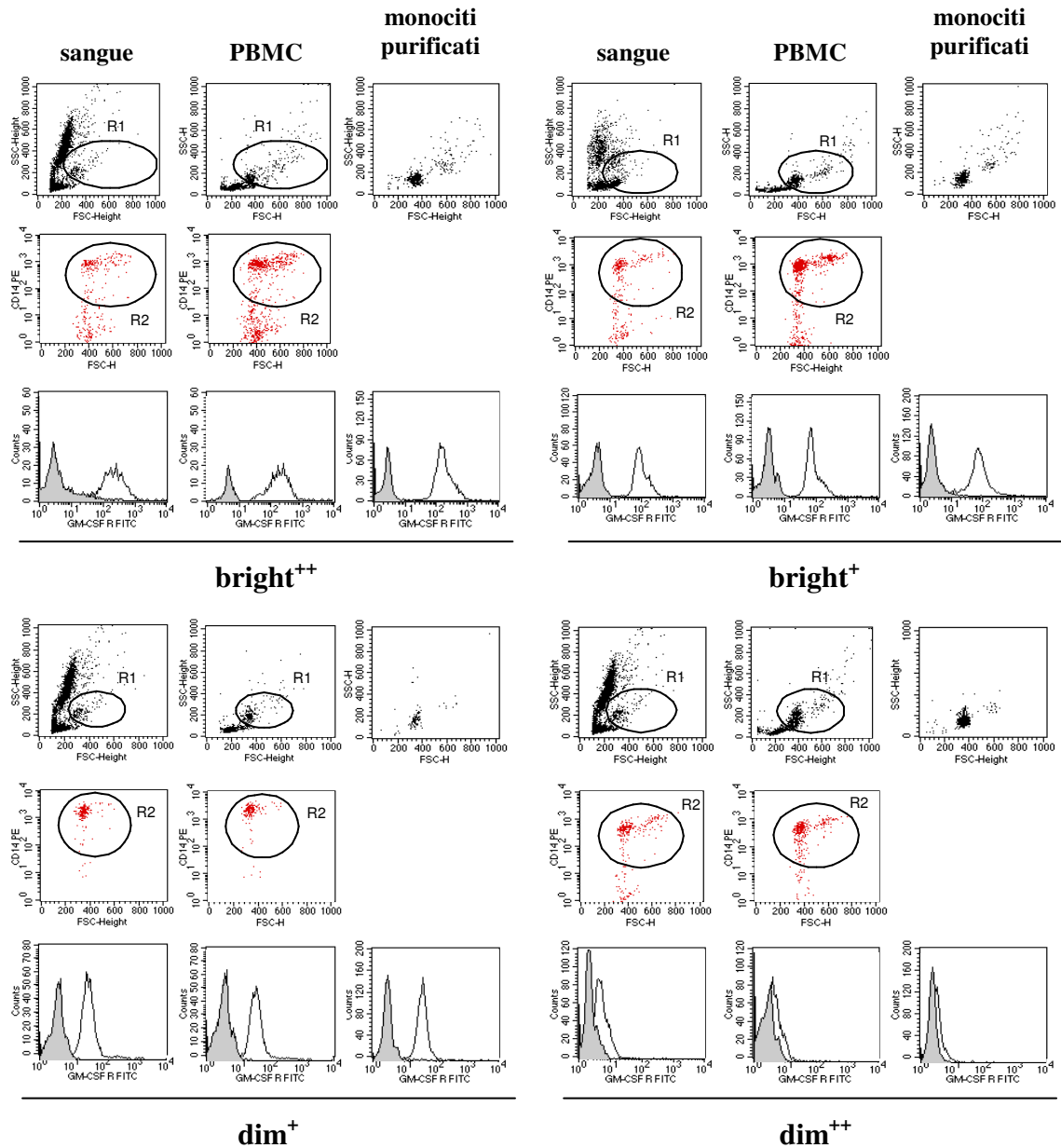
(Figura 8B), nelle IL-4 DC, questi stessi anticorpi non hanno avuto pressoché effetto (Figura 9A). Da notare, inoltre, che la neutralizzazione dell'IL-10 non influenza la produzione di IL-23 (Figura 9A), suggerendo quindi che l'IL-12 e l'IL-23 sono regolate in modo diverso da questa citochina. Le GM-DC e le IL-4 DC mature, infatti, producono equivalenti quantità di IL-23, nonostante i differenti livelli di IL-10 rilasciati (Figure 8, 9). Infine, parallelamente all'incrementata produzione di IL-12, aumenta significativamente anche la capacità proliferativa dei linfociti alloigenici co-coltivati con le GM-DC esposte agli anticorpi anti-IL-10 (Figura 9B) e, con questa, i livelli di IFN- $\gamma$  rilasciati dagli stessi linfociti (Figura 9C).



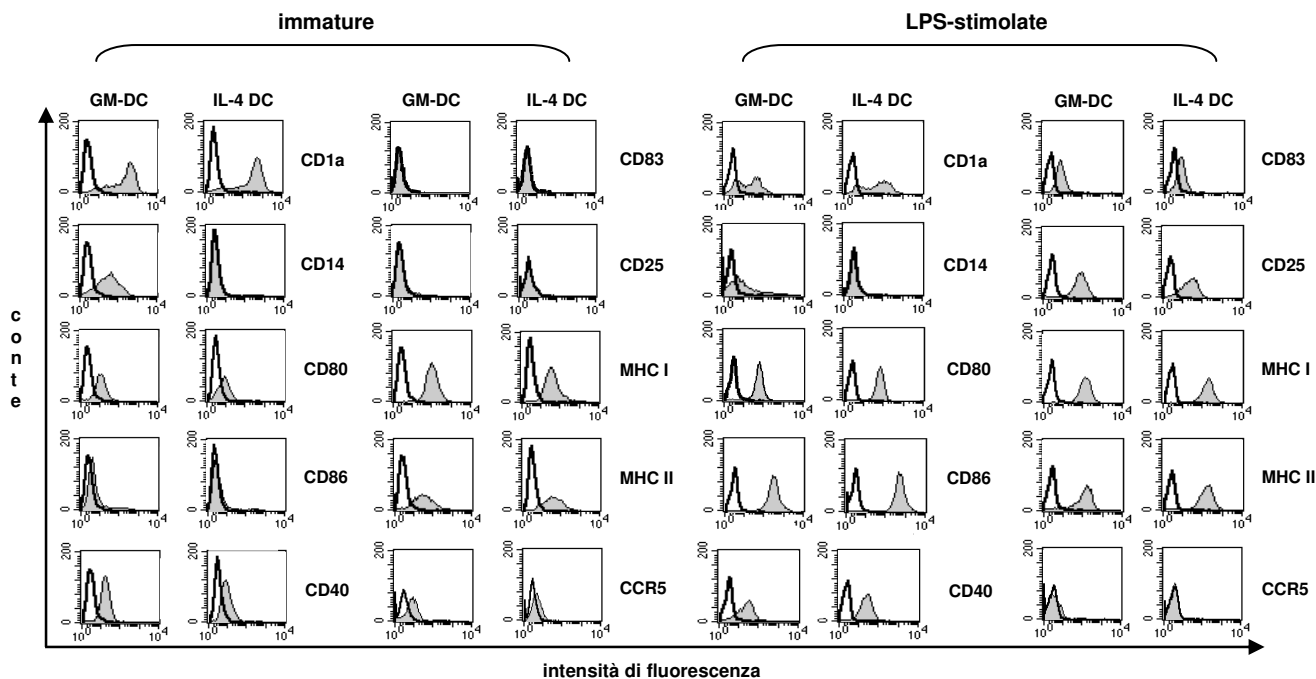
**Figura 1:** Schema sperimentale.



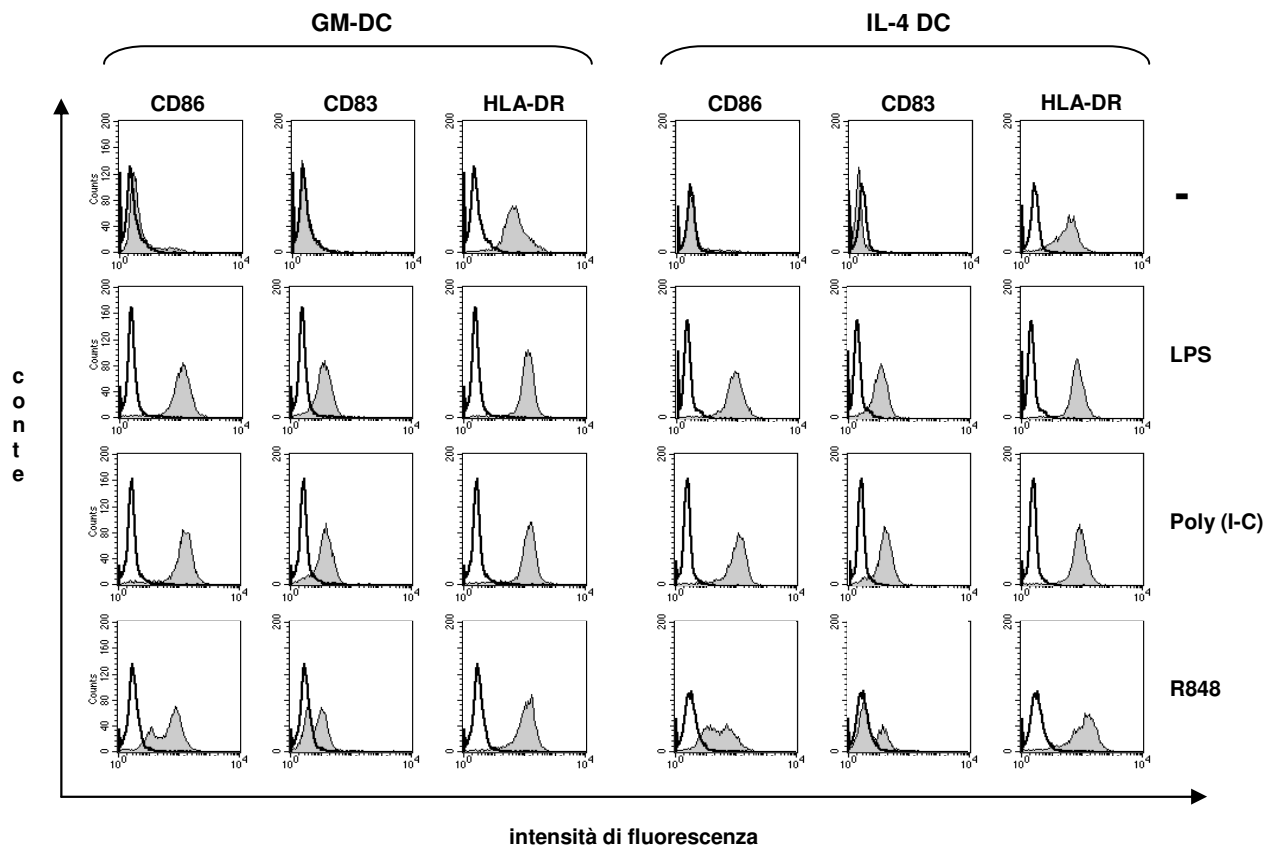
**Figura 2:** *Variazione donatore-dipendente dell'espressione della subunità  $\alpha$  del GM-CSFR in monociti del sangue periferico umano. I monociti appena isolati sono stati marcati con anticorpi anti-GM-CSFR $\alpha$ , come descritto in Materiali e metodi, e analizzati mediante citofluorimetria. I valori relativi agli isotipi di controllo sono raffigurati con istogrammi pieni mentre gli istogrammi vuoti rappresentano i valori della marcatura specifica. Qui sono riportati i risultati da 4 categorie rappresentative di donatori, ricavati dall'analisi di un totale di 20 differenti donatori sani.*



**Figura 3:** Analisi dell'espressione del GM-CSFR $\alpha$  in monociti prima e dopo la purificazione dal sangue periferico di donatori sani. Il sangue, i PBMC totali e i monociti purificati dallo stesso donatore sono stati doppiamente marcati con anticorpi anti-GM-CSFR $\alpha$  FITC e anti-CD14 PE, lavati ed analizzati per citofluorimetria. I pannelli mostrano l'espressione del GM-CSFR $\alpha$  in monociti di quattro rappresentativi donatori sani (bright $^{++}$ , bright $^{+}$ , dim $^{+}$ , dim $^{++}$ ), prima del loro isolamento dal sangue o dai PBMC e dopo purificazione. La frazione monocitaria, nei campioni di sangue e di PBMC totali, è stata identificata sulla base dei parametri fisici FSC/SSC (R1) e caratterizzata per l'espressione del marker monocitario CD14. I valori relativi agli isotipi di controllo sono raffigurati con istogrammi pieni mentre gli istogrammi vuoti rappresentano i valori dell'espressione del GM-CSFR $\alpha$  nelle popolazioni CD14-positive (R2).

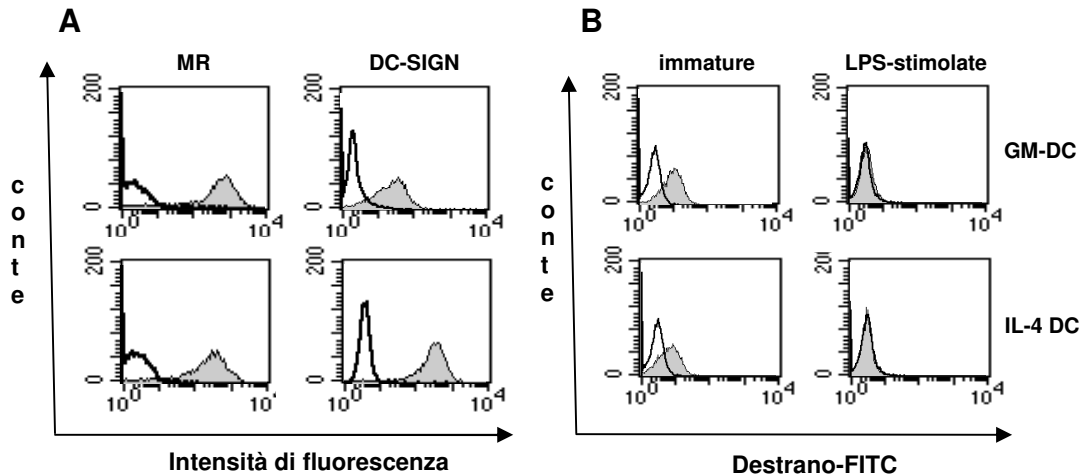


**Figura 4:** Analisi fenotipica delle DC generate in presenza del solo GM-CSF. I monociti sono stati coltivati in presenza di GM-CSF da solo (GM-DC) o in combinazione con IL-4 (IL-4 DC), per tre giorni e successivamente trattati o non con LPS (200 ng/ml) per 48 ore. A cinque giorni, le cellule sono state quindi marcate come descritto in Materiali e metodi, e analizzate mediante citofluorimetria. I valori relativi agli isotipi di controllo sono raffigurati con istogrammi vuoti mentre gli istogrammi pieni rappresentano i valori della marcatura specifica. Sono riportati i risultati di un esperimento rappresentativo su un totale di cinque.

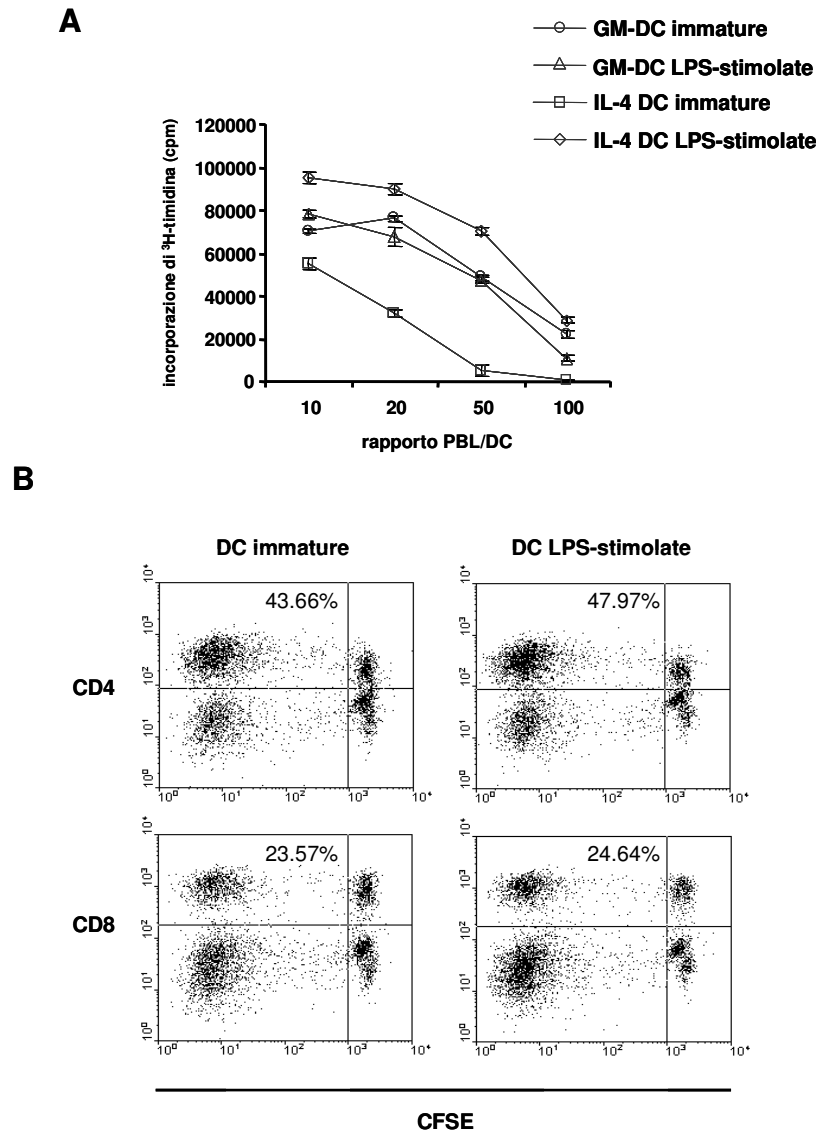


**Figura 5:** Analisi fenotipica delle GM-DC stimulate con poly I-C e R848. Le GM-DC e le IL-4 DC sono state trattate con LPS (200 ng/ml), poli I-C (20  $\mu$ g/ml) o R848 (2  $\mu$ g/ml) al giorno tre di coltura. Dopo 48 ore, le cellule sono state processate e analizzate come descritto per la figura 4. Sono riportati i risultati di un esperimento rappresentativo su un totale di tre.

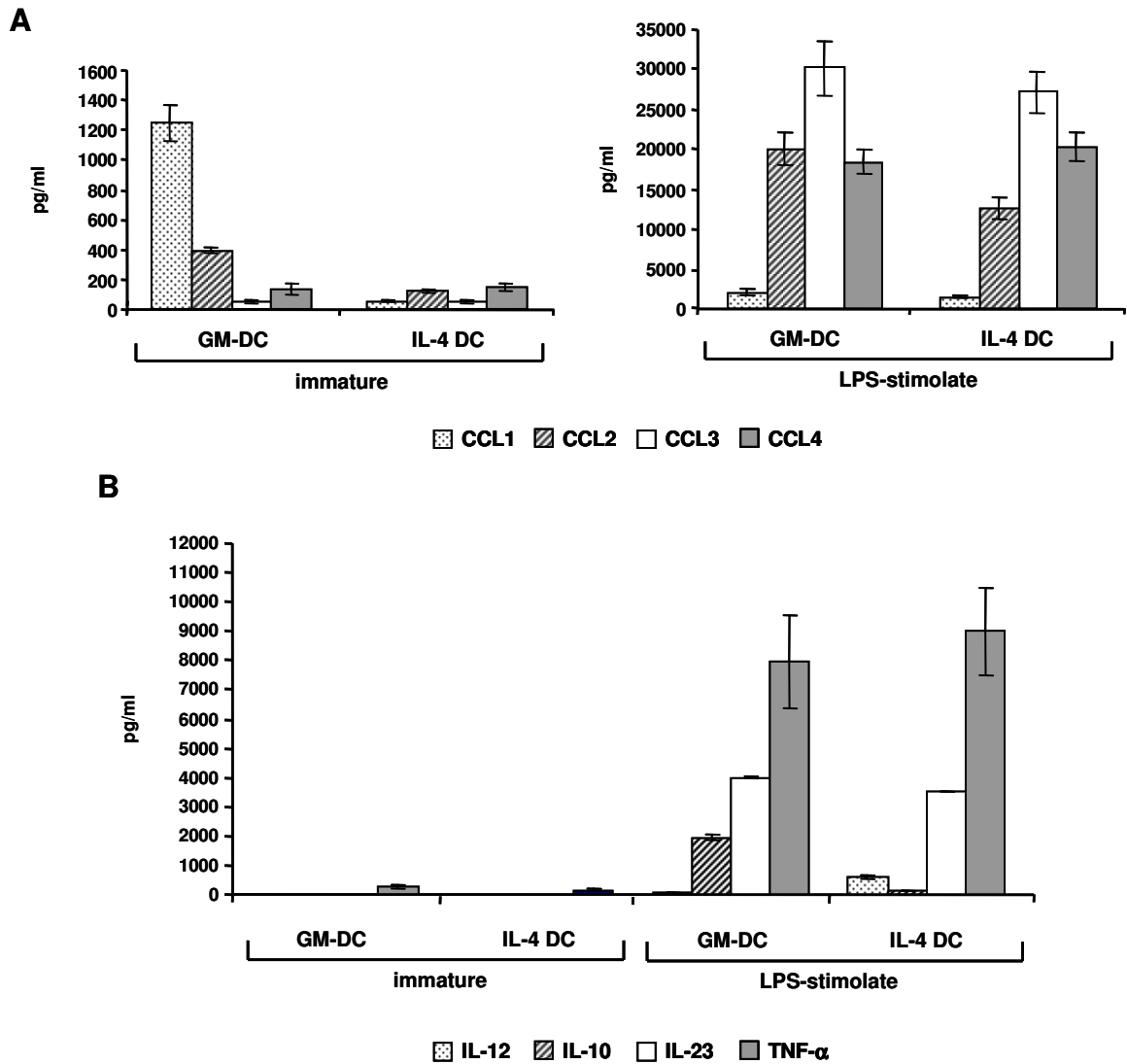




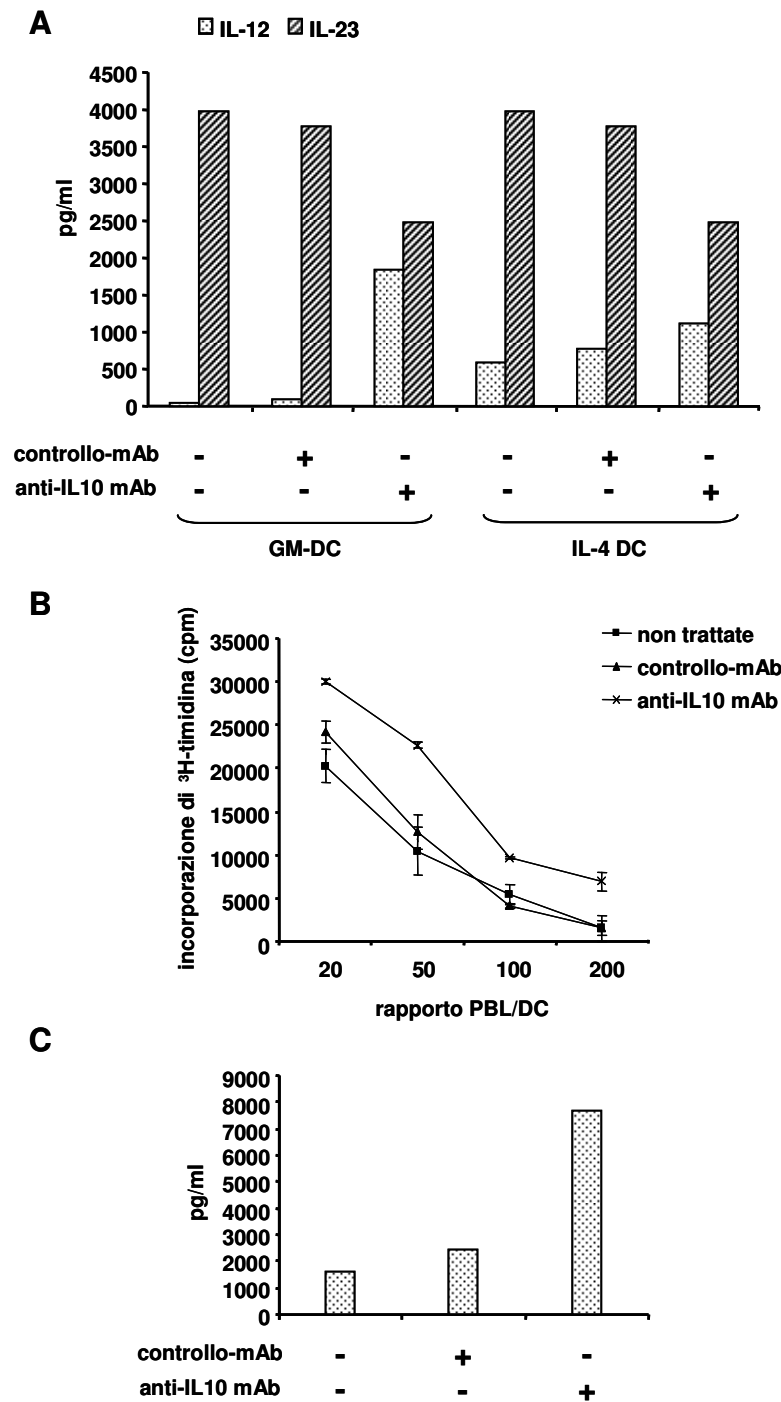
**Figura 6:** *Espressione di C-type lectins e capacità di catturare l'antigene delle GM-DC. (A) I monociti coltivati per cinque giorni in presenza di GM-CSF da solo o GM-CSF e IL-4 sono stati marcati con anticorpi specifici anti-DC-SIGN o MR come descritto in Materiali e metodi, e infine analizzati mediante citofluorimetria. I valori relativi agli isotipi di controllo sono raffigurati con istogrammi vuoti mentre gli istogrammi pieni rappresentano i valori della marcatura specifica. Sono riportati i risultati di un esperimento rappresentativo su un totale di cinque. (B) Le DC immature e quelle stimulate con LPS, raccolte a cinque giorni di coltura, sono state marcate con destrano-FITC come descritto in Materiali e metodi e analizzate per citofluorimetria. Gli istogrammi vuoti rappresentano la marcatura di fondo delle cellule incubate con destrano-FITC a 0°C. Sono riportati i risultati di un esperimento rappresentativo su un totale di tre.*



**Figura 7: Induzione dell'espansione di linfociti allogenici da parte delle GM-DC.** (A) Le GM-DC immature e quelle stimolate con LPS come pure le classiche IL-4 DC, raccolte al giorno 5 di coltura, sono state lavate e seminate in colture miste con PBL allogenici nei rapporti riportati in figura. I livelli di  $^3\text{H}$ -timidina incorporati sono stati determinati dopo cinque giorni di co-coltura. I risultati sono riportati come media dei cpm  $\pm$  SD dei triplicati di ciascuna co-coltura. (B) Le GM-DC immature e quelle stimolate con LPS sono state seminate in colture miste con PBL marcati con CFSE nel rapporto 1:10. Al giorno 8, i linfociti sono stati doppiamente marcati con anticorpi anti-CD3 e anti-CD4 o anti-CD8, come descritto nei Materiali e metodi. I plot mostrano popolazioni linfocitarie CD3<sup>+</sup>. Le percentuali di cellule T proliferanti CFSE-negative sono riportate. Le cellule CD3<sup>-</sup> sono state escluse dall'analisi. In (A) e (B) sono riportati i risultati di un esperimento rappresentativo su un totale di tre.



**Figura 8: Produzione di CC chemochine e citochine da parte delle GM-DC.** Le GM-DC immature come pure le IL-4 DC sono state stimolate al giorno 3 di coltura con LPS. Dopo 48h, i sopranatanti delle stesse colture sono stati raccolti e testati per il contenuto di CCL1, CCL2, CCL3 e CCL4 (A) o IL-12, IL-10, IL-23 e TNF- $\alpha$  (B) attraverso saggi ELISA, come descritto in Materiali e metodi. I risultati mostrati derivano dalla media dei valori  $\pm$  SD dei triplicati di ciascuna coltura. In (A) e (B) sono riportati i risultati di un esperimento rappresentativo su un totale di quattro.



**Figura 9:** Effetto della neutralizzazione dell'IL-10 sulle proprietà funzionali delle GM-DC mature. I monociti sono stati coltivati con GM-CSF o GM-CSF e IL-4 per tre giorni e dopo stimolati con LPS in presenza o in assenza di anticorpi neutralizzanti anti-IL-10 o anticorpi di controllo IgG2b. Dopo 48h, le DC ottenute sono state analizzate per la produzione di IL-12 e IL-23 mediante ELISA (A) come pure per la loro capacità allostimolatoria (B) o di indurre secrezione di IFN- $\gamma$  da parte di linfociti alloigenici (C).

Tipo di donatore (gruppi arbitrari basati sui valori di MFI della catena $\alpha$ del GM-CSFR)	Numero di donatori ( $n = 20$ )	Espressione del GM-CSFR $\alpha$ (MFI = media $\pm$ SD)	GM-CSF +	GM-CSF	
			IL-4	Percentuale di cellule CD71 $^+$ (media $\pm$ SD)	Percentuale di cellule CD1a $^+$ (media $\pm$ SD)
GM-CSFR <sup>bright++</sup>	9	180.3 $\pm$ 7.5	61.4 $\pm$ 2.0	0	63.6 $\pm$ 2.1
GM-CSFR <sup>bright+</sup>	5	60.5 $\pm$ 2.5	56.5 $\pm$ 1.9	9.3 $\pm$ 2.2	52.7 $\pm$ 2.7
GM-CSFR <sup>dim+</sup>	4	25.6 $\pm$ 2.6	53 $\pm$ 2.3	40.9 $\pm$ 4.2	21.5 $\pm$ 3.5
GM-CSFR <sup>dim++</sup>	2	8.4-10.1 <sup>a)</sup>	19.5-23.8 <sup>a)</sup>	56.4-58.5 <sup>a)</sup>	1.4-3.5 <sup>a)</sup>

**Tabella 1:** Correlazione tra l'espressione della subunità  $\alpha$  del GM-CSFR in monociti e la loro capacità di differenziare in cellule CD71 $^+$  o CD1a $^+$ . In tabella sono riportati i valori, in termini di MFI, relativi all'espressione superficiale della catena  $\alpha$  del GM-CSFR in monociti isolati da 20 differenti donatori sani, raggruppati in 4 categorie (vedi Figura 2). In parallelo sono mostrate anche le percentuali di cellule CD1a $^+$  o CD71 $^+$  ricavate al giorno 5 da colture esposte al GM-CSF + IL-4 o al GM-CSF da solo.

<sup>a)</sup> Per questo gruppo non è stato calcolato alcun valore di SD a causa del numero di donatori trovati pari a 2.

	-	CCL4	CCL19
GM-iDC	2.83 ± 0.24	25.47 ± 2.81	10.16 ± 2.91
GM-mDC	0.16 ± 0.03	1.70 ± 0.18	12.33 ± 4.3
IL-4 iDC	2.3 ± 0.46	12.5 ± 1.99	2.5 ± 1.18
IL-4 mDC	1 ± 0.47	1.3 ± 0.2	27 ± 0.87

***Tabella 2: Attività chemiotattica delle GM-DC.*** Al giorno 5 di coltura le cellule immature e quelle stimulate con LPS, generate con GM-CSF o GM-CSF e IL-4, sono state testate per la loro capacità di migrare in risposta alle chemochine CCL4 e CCL19, come descritto in Materiali e metodi. I risultati riportati in tabella sono mostrati come numero di cellule migranti  $\times 10^4$  (valori medi  $\pm$  SD dei campioni in triplicato). Sono riportati i risultati di un esperimento rappresentativo su un totale di tre.

## - *Discussione* -

In questo studio abbiamo osservato che l'esposizione di monociti umani al GM-CSF, in assenza di qualsiasi altro fattore di crescita o citochina, può indurre il differenziamento degli stessi in macrofagi o DC. In particolare, abbiamo visto che la porzione di cellule macrofago-*like* CD71<sup>+</sup> o DC-*like* CD1a<sup>+</sup> che può essere recuperata da colture di monociti esposte al GM-CSF dipende dal donatore. Infatti, abbiamo osservato che la capacità dei monociti precursori di differenziare in DC in risposta al solo GM-CSF correla positivamente con i livelli di espressione della catena  $\alpha$  del GM-CSFR sulla loro superficie. Questo ha indicato che l'espressione del GM-CSFR $\alpha$  a livello di singola cellula può rappresentare uno dei meccanismi che controllano il differenziamento dei monociti, guidato dal solo GM-CSF, in DC o macrofagi. A tal proposito, è stato recentemente descritto che le differenti risposte biologiche indotte dal GM-CSF sono mediate da differenti segnali innescati dal suo recettore, in base alla concentrazione del GM-CSF stesso e, ancora, che il GM-CSF può favorire la sola sopravvivenza cellulare oppure, oltre a

questa, indurre proliferazione, differenziamento o attivazione funzionale, in base ai residui fosforilati sulla catena  $\beta$  del suo recettore (*Guthridge et al., 2006*). Sebbene noi non abbiamo osservato alcuna variazione donatore-dipendente nei livelli di espressione, per altro bassi, della catena  $\beta$  del GM-CSFR è plausibile, stando a quanto già descritto, che una differente densità di superficie della catena  $\alpha$  possa allo stesso modo influenzare il tipo di segnale derivato dal GM-CSF e, infine, portare all'incremento della sola sopravvivenza, con conseguente differenziamento dei monociti in macrofagi, oppure guidare il differenziamento dei monociti stessi in DC. Va sottolineato, comunque, che tutto ciò vale solo quando i monociti sono esposti al GM-CSF in assenza di qualsiasi altro fattore o citochina. Infatti, dal nostro studio è emerso che la capacità dei monociti di differenziare in DC in presenza di GM-CSF e IL-4 non è donatore-dipendente, suggerendo che la dipendenza dai livelli di espressione del GM-CSFR $\alpha$  può essere abrogata dalla presenza dell'IL-4. Queste osservazioni, unite alla osservata variabilità nell'espressione sui monociti del GM-



CSFR $\alpha$  in diversi donatori e alla dimostrazione che monociti da donatori GM-CSFRdim++ sono refrattari a differenziare in DC quando stimolati con GM-CSF da solo, possono motivare la discrepanza tra i nostri risultati e quelli precedentemente riportati, che dimostrano che monociti esposti al GM-CSF, in assenza di altre citochine, non differenziano in cellule DC-like (Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Mohamadzadeh et al., 2001). In linea con i nostri dati invece, alcuni studi hanno indicato che il GM-CSF è di per se sufficiente ad aumentare l'espressione di superficie delle molecole CD1a e B7 in monociti (Kasinrerk et al., 1993; Yamasaki et al., 1995).

Il GM-CSF è da tempo usato come adiuvante per vaccini anti-virali e anti-tumoriali (Parmiani et al., 2006). Così, l'evidenza che l'esposizione di monociti al solo GM-CSF è sufficiente ad indurre il differenziamento degli stessi in DC, suggerisce anche che questa nuova potenzialità del GM-CSF, da noi descritta, potrebbe contribuire all'effetto adiuvante di questo fattore. Va ricordato, comunque, che alcuni studi non sono riusciti a dimostrare un'attività vaccino-adiuvante associata al GM-CSF

(Parmiani et al., 2006). Tenendo conto però della considerevole variabilità dell'espressione del GM-CSFR $\alpha$  osservata in differenti donatori e fortemente associata alla possibilità di poter ottenere in vitro DC da monociti esposti al GM-CSF da solo (Tabella 1), è ragionevole assumere che la bassa attività adiuvante del GM-CSF, riscontrata in alcuni pazienti, possa essere dovuta alla difettiva espressione del GM-CSFR $\alpha$  sui monociti di questi stessi pazienti.

Nel nostro studio, inoltre, abbiamo osservato che le cellule CD1a<sup>+</sup>, recuperate da colture monocitarie esposte al GM-CSF da solo, esibiscono molte delle caratteristiche fenotipiche e funzionali delle classiche DC. Infatti, esprimono allo stadio immaturo molecole costimolatorie e antigeni MHC, come pure lectine di tipo C e, dopo stimolazione dei TLR, proprietà fenotipiche e funzionali proprie delle DC mature, incluse l'espressione dei classici *markers* di maturazione, l'aumento di molecole costimolatorie e antigeni MHC di classe I e II, e la diminuzione del CCR5 e delle risposte migratorie ai suoi ligandi. Inoltre, abbiamo anche dimostrato che le GM-DC,

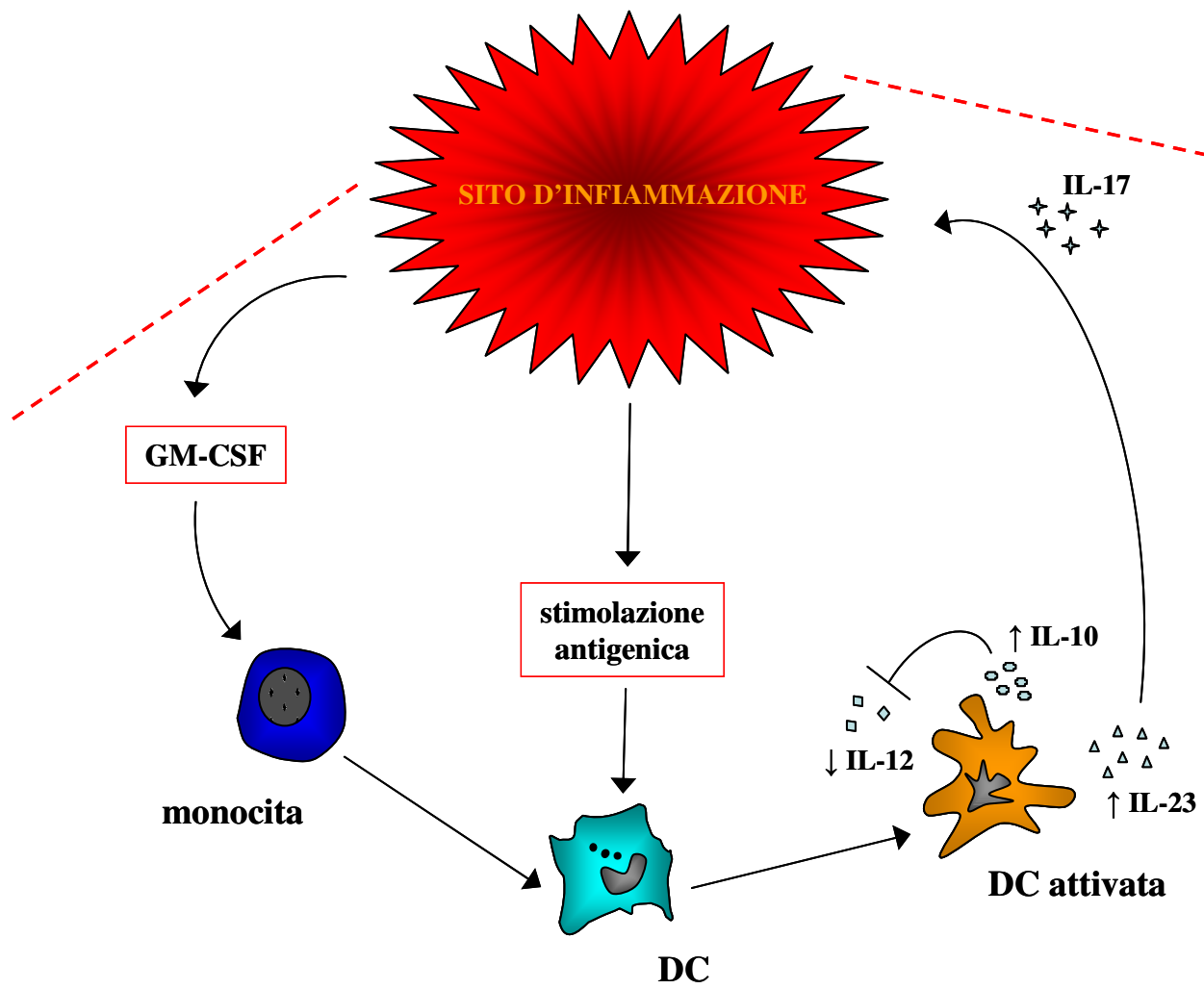
nonostante siano in grado di rilasciare bassissimi livelli di IL-12, esibiscono un'alta attività allostimolatoria caratterizzata dall'espansione di linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e produzione, da parte di questi, di IFN- $\gamma$ . Riguardo ciò, rimane però ancora da capire se l'elevata secrezione costitutiva di CCL1, da parte delle GM-DC, possa giocare un ruolo nel proteggere i linfociti T dall'induzione di apoptosi, come precedentemente descritto (*Van Snick et al., 1996*), e in ultimo favorire le risposte proliferative degli stessi. In generale, comunque, va sottolineato che tutte queste proprietà funzionali sono state riscontrate nelle GM-DC già allo stadio immaturo e non aumentano ulteriormente dopo induzione di maturazione. Inoltre, le GM-DC immature esibiscono anche una chiara risposta migratoria alla CCL19, ligando del CCR7, una caratteristica tipica delle DC attivate (*Lipscomb & Masten, 2002*).

Infine, abbiamo osservato che le GM-DC maturate con LPS sono in grado di produrre un'elevata quantità di IL-10, la quale a sua volta regola, in modo negativo, l'attivazione fenotipica e funzionale delle stesse. Infatti, abbiamo visto che la

neutralizzazione dell'attività biologica dell'IL-10 è sufficiente a ripristinare una buona produzione di IL-12 da parte delle GM-DC mature e ad aumentare la loro capacità allostimolatoria e l'induzione della produzione di IFN- $\gamma$ . Le GM-DC mature secernono anche l'IL-23, una citochina eterodimerica strettamente correlata all'IL-12 (*Langrish et al., 2004*) ma mentre quest'ultima guida la classica risposta Th1, caratterizzata dalla produzione di IFN- $\gamma$ , l'IL-23 invece induce l'espansione di una popolazione di cellule T capace di produrre IL-17 (*Aggarwal et al., 2003*). A tal proposito, è stato recentemente dimostrato che alcuni disordini autoimmuni possono essere mediati da un'alterata risposta IL-23/IL-17 e che il GM-CSF svolge un ruolo chiave proprio in alcune malattie infiammatorie e autoimmuni (*Hamilton, 2002*). Così, alla luce di tutte queste evidenze, abbiamo voluto speculare sul seguente scenario: similmente ad altre citochine pro-infiammatorie, il GM-CSF è in gran parte prodotto e agisce localmente al sito d'infiammazione, come osservato nelle biopsie della pelle da pazienti allergici (*Kay et al., 1991*) e nei fluidi giunzionali di pazienti con artrite

(Williamson *et al.*, 1998). Il GM-CSF rilasciato al sito d'infiammazione quindi potrebbe contribuire alla generazione di DC dotate di distinte proprietà fenotipiche e funzionali ed in particolare della capacità di secernere, dopo appropriata stimolazione, alti livelli di IL-23 e IL-10. A questo punto poi, mentre IL-10 potrebbe esercitare un forte effetto inibitorio sulla produzione di IL-12 senza però influenzare quella dell'IL-23, quest'ultima, a sua volta, potrebbe indurre la produzione di IL-17 perpetuando il *loop* infiammatorio (Figura 10). È interessante notare, a tal proposito, come un recente studio abbia dimostrato come l'IL-23 sia in grado di indurre produzione di IL-17 nei polmoni di pazienti con asma allergica e come l'IL-17 sia richiesta in maniera specifica durante la sensibilizzazione antigenica nello sviluppo dell'asma allergica (Schnyder-Candrian *et al.*, 2006). Ulteriori studi comunque sono necessari per meglio definire il possibile loop regolatorio innescato dalle GM-DC e la loro eventuale implicazione in specifiche patologie immuno-mediate. Principalmente comunque i nostri dati supportano l'ipotesi che il GM-CSF può rappresentare la

richiesta minima per la generazione di DC mieloidi da precursori monocitari presenti nei distretti corporei o tessuti dove questa citochina è prodotta. Al tempo stesso, poi, o in un secondo momento, invece, l'esposizione a stimoli tessuto-specifici, quali IL-4, IL-15, IFN-I od altri, a seconda del microambiente trovato (sensibilizzazione allergenica, crescita tumorale, infezioni virali o batteriche, etc.), potrebbe, infine, portare queste stesse DC all'acquisizione di più "specializzate" funzioni, determinandone l'orientamento finale e di conseguenza il tipo di risposta indotta a carico delle cellule T.



**Figura 10:** Possibile amplificazione del loop infiammatorio da parte del GM-CSF.

## - Bibliografia -

**Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. and Gurney, A. L.,** Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003. **278**: 1910-1914.

**Akagawa, K. S., Komuro, I., Kanazawa, H., Yamazaki, T., Mochida, K. and Kishi, F.,** Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology* 2006. **11 Suppl**: S32-36.

**Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran and A.K. Palucka,** Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol* 2000. **18**: 767-811.

**Bromley, S.K., W.R. Burack, K.G. Johnson, K. Somersalo, T.N. Sims, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen and M.L. Dustin,** The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol* 2001. **19**: 375-396.

**Bruno, L., Seidl, T. and Lanzavecchia, A.,** Mouse pre-immunocytes as non-proliferating multipotent precursors of macrophages, interferon-producing cells, CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001. **31**: 3403-3412.

**Cao, X., M. Sugita, N. van der Wel, J. Lai, R.A. Rogers, P.J. Peters and M.B. Brenner,** CD1 molecules efficiently present antigen in immature dendritic cells and traffic independently of MHC class II during dendritic cell maturation. *J. Immunol* 2002. **169**: 4770-4777.



**Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M. C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A. and Vicari, A.,** Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* 2000. **22**: 345-369.

**Conti, L., Casetti, R., Cardone, M., Varano, B., Martino, A., Belardelli, F., Poccia, F. and Gessani, S.,** Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol* 2005. **174**: 252-260.

**Ebner, S., Ratzinger, G., Krosbacher, B., Schmuth, M., Weiss, A., Reider, D., Kroczeck, R. A., Herold, M., Heufler, C., Fritsch, P. and Romani, N.,** Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. *J Immunol* 2001. **166**: 633-641.

**Fleetwood, A. J., Cook, A. D. and Hamilton, J. A.,** Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Crit Rev Immunol* 2005. **25**: 405-428.

**Fogg, D. K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D. R., Cumano, A. and Geissmann, F.,** A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006. **311**: 83-87.

**Gasson, J.C.,** Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1991. **77**: 1131-45.

**Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J. P., Dy, M., Brousse, N. and Hermine, O.,** Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* 1998. **187**: 961-966.

**Geissmann, F., Jung, S. and Littman, D. R.,** Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003. **19**: 71-82.

**Gessani, S., Testa, U., Varano, B., Di Marzio, P., Borghi, P., Conti, L., Barberi, T., Tritarelli, E., Martucci, R., Seripa, D. and et al.,** Enhanced production of LPS-induced cytokines during differentiation of human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors. *J Immunol* 1993. **151**: 3758-3766.

**Gessani, S., L. Fantuzzi, P. Puddu and F. Belardelli,** Purification of macrophages. In: Paulnock, D.M., Macrophages. *Oxford Univ. Press, N.Y.* 2000. pp. 31-57.

**Grakoui, A., S.K. Bromley, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen and M.L. Dustin,** The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999. **285**: 221-227.

**Guthridge, M. A., Stomski, F. C., Thomas, D., Woodcock, J. M., Bagley, C. J., Berndt, M. C. and Lopez, A. F.,** Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* 1998. **16**: 301-313.

**Guthridge, M. A., Powell, J. A., Barry, E. F., Stomski, F. C., McClure, B. J., Ramshaw, H., Felquer, F. A., Dottore, M., Thomas, D. T., To, B., Begley, C. G. and Lopez, A. F.,** Growth factor pleiotropy is controlled by a receptor Tyr/Ser motif that acts as a binary switch. *Embo J* 2006. **25**: 479-489.

**Hamilton, J. A.,** GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol* 2002. **23**: 403-408.

**Hart, D.N.J.,** Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997. **90**: 3245-3287.

**Hochrein, H., O'Keeffe, M., Luft, T., Vandenabeele, S., Grumont, R. J., Maraskovsky, E. and Shortman, K.,** Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp Med* 2000. **192**: 823-833.

**Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. and Steinman, R. M.,** Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992. **176**: 1693-1702.

**Inaba, K., Inaba, M., Deguchi, M., Hagi, K., Yasumizu, R., Ikehara, S., Muramatsu, S. and Steinman, R. M.,** Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 3038-3042.

**Kasinrerk, W., Baumruker, T., Majdic, O., Knapp, W. and Stockinger, H.,** CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 1993. **150**: 579-584.

**Kay, A. B., Ying, S., Varney, V., Gaga, M., Durham, S. R., Moqbel, R., Wardlaw, A. J. and Hamid, Q.,** Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Exp Med* 1991. **173**: 775-778.

**Langrish, C. L., McKenzie, B. S., Wilson, N. J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R. A. and Cua, D. J.,** IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2004. **202**: 96-105.

**Lipscomb, M. F. and Masten, B. J.,** Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002. **82**: 97-130.

**Lu, L., Hsieh, M., Oriss, T. B., Morel, P. A., Starzl, T. E., Rao, A. S. and Thomson, A. W.,** Generation of DC from mouse spleen cell cultures in response to GM-CSF: immunophenotypic and functional analyses. *Immunology* 1995. **84**: 127-134.

**Masurier, C., Pioche-Durieu, C., Colombo, B. M., Lacave, R., Lemoine, F. M., Klatzmann, D. and Guigon, M.,** Immunophenotypical and functional heterogeneity of dendritic cells generated from murine bone marrow cultured with different cytokine combinations: implications for anti-tumoral cell therapy. *Immunology* 1999. **96**: 569-577.

**Means, T.K., F. Hayashi, K.D. Smith, A. Aderem and A.D. Luster,** The toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J. Immunol* 2003. **170**: 5165-5175.

**Mellman, I. and R.M. Steinman,** Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001. **106**: 255-258.

**Metcalf, D., Burgess, A. W., Johnson, G. R., Nicola, N. A., Nice, E. C., DeLamararter, J., Thatcher, D. R. and Mermod, J. J.,** In vitro actions on hemopoietic cells of recombinant murine GM-CSF purified after production in *Escherichia coli*: comparison with purified native GM-CSF. *J Cell Physiol* 1986. **128**: 421-431.

**Mohamadzadeh, M., Berard, F., Essert, G., Chalouni, C., Pulendran, B., Davoust, J., Bridges, G., Palucka, A. K. and Banchereau, J.,** Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med* 2001. **194**: 1013-1020.

**Oster, W., Mertelsmann, R. and Herrmann, F.,** Role of colony-stimulating factors in the biology of acute myelogenous leukemia. *Int J Cell Cloning* 1989. **7**: 13-29.

**Parmiani, G., Castelli, C., Pilla, L., Santinami, M., Colombo, M. P. and Rivoltini, L.,** Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann Oncol* 2006.

**Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M. and Muller, W. A.,** Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 1999. **11**: 753-761.

**Sallerfors, B.,** Endogenous production and peripheral blood levels of granulocyte-macrophage (GM-) and granulocyte (G-) colony-stimulating factors. *Leuk Lymphoma* 1994. **13**: 235-247.

**Sallusto, F. and Lanzavecchia, A.,** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994. **179**: 1109-1118.

**Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C.R. Mackay, S. Quin and A. Lanzavecchia,** Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 1998. **28**: 2760-2769.

**Santini, S. M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio, T. and Belardelli, F.,** Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 2000. **191**: 1777-1788.

**Schnyder-Candrian, S., Togbe, D., Couillin, I., Mercier, I., Brombacher, F., Quesniaux, V., Fossiez, F., Ryffel, B. and Schnyder, B.,** Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 2006. **203**: 2715-2725.

**Schreurs, M. W., Eggert, A. A., de Boer, A. J., Figdor, C. G. and Adema, G. J.,** Generation and functional characterization of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999. **29**: 2835-2841.

**Shakoory, B., Fitzgerald, S. M., Lee, S. A., Chi, D. S. and Krishnaswamy, G.,** The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. *J Interferon Cytokine Res* 2004. **24**: 271-281.

**Sozzani, S., P. Allavena, A. Vecchi and A. Mantovani,** Chemokines and dendritic cell traffic. *J. Clin. Immunol.* 2000. **20**: 151-160.

**Steinman, R.M., D. Hawiger, K. Liu, L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, T. Iyoda, J. Ravetch, M. Dhodapkar, K. Inaba and M. Nussenzweig,** Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003. **987**: 15-25.

**Suzuki, H., Katayama, N., Ikuta, Y., Mukai, K., Fujieda, A., Mitani, H., Araki, H., Miyashita, H., Hoshino, N., Nishikawa, H., Nishii, K., Minami, N. and Shiku, H.,** Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on monocytes. *Am J Hematol* 2004. **75**: 179-189.

**Théry, C. and S. Amigorena,** The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2001. **13**: 45-51.

**van der Merwe, P.A.,** Formation and function of the immunological synapse. *Curr. Opin. Immunol.* 2002. **14**: 293-298.

**Van Snick, J., Houssiau, F., Proost, P., Van Damme, J. and Renauld, J. C.,** I-309/T cell activation gene-3 chemokine protects murine T cell lymphomas against dexamethasone-induced apoptosis. *J Immunol* 1996. **157**: 2570-2576.

**Williamson, D. J., Begley, C. G., Vadas, M. A. and Metcalf, D.,** The detection and initial characterization of colony-stimulating factors in synovial fluid. *Clin Exp Immunol* 1998. **72**: 67-73.

**Yamasaki, S., Okino, T., Chakraborty, N. G., Adkisson, W. O., Sampieri, A., Padula, S. J., Mauri, F. and Mukherji, B.,** Presentation of synthetic peptide antigen encoded by the MAGE-1 gene by granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor-cultured macrophages from HLA-A1 melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 1995. **40**: 268-271.

**Yao, Y., Li, W., Kaplan, M. H. and Chang, C. H.,** Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *J Exp Med* 2005. **201**: 1899-1903.

**Zou, G. M. and Tam, Y. K.,** Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw* 2002. **13**: 186-199.



## **- Indice delle Figure e delle Tabelle -**

### **Risultati - Figure**

<b><u>Figura 1:</u></b> Schema sperimentale.....	51
<b><u>Figura 2:</u></b> Variazione donatore-dipendente dell'espressione della subunità $\alpha$ del GM-CSFR in monociti del sangue periferico umano.....	52
<b><u>Figura 3:</u></b> Analisi dell'espressione del GM-CSFR $\alpha$ in monociti prima e dopo la purificazione dal sangue periferico di donatori sani.....	53
<b><u>Figura 4:</u></b> Analisi fenotipica delle DC generate in presenza del solo GM-CSF.....	54
<b><u>Figura 5:</u></b> Analisi fenotipica delle GM-DC stimulate con poly I-C e R848.....	55
<b><u>Figura 6:</u></b> Espressione di C-type lectins e capacità di catturare l'antigene delle GM-DC.....	56
<b><u>Figura 7:</u></b> Induzione dell'espansione di linfociti allogenici da parte delle GM-DC.....	57
<b><u>Figura 8:</u></b> Produzione di CC chemochine e citochine da parte delle GM-DC.....	58
<b><u>Figura 9:</u></b> Effetto della neutralizzazione dell'IL-10 sulle proprietà funzionali delle GM-DC mature.....	59

## **Risultati - Tabelle**

<b><u>Tabella 1:</u></b> <i>Correlazione tra l'espressione della subunità <math>\alpha</math> del GM-CSFR in monociti e la loro capacità di differenziare in cellule CD71<sup>+</sup> o CD1a<sup>+</sup></i> .....	60
<b><u>Tabella 2:</u></b> <i>Attività chemiotattica delle GM-DC</i> .....	61

## **Discussione - Figure**

<b><u>Figura 10:</u></b> <i>Possibile amplificazione del loop infiammatorio da parte del GM-CSF</i> .....	70
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----