

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

**Centro Interdipartimentale di Ricerca e di Servizi
per la Biologia e la Medicina della Rigenerazione**

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
INDIRIZZO INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI
XXV CICLO

TESI DI DOTTORATO

EFFETTO DELL'INIBIZIONE DEL SISTEMA ADRENOMEDULLINICO IN UNA LINEA PROMIELOCITICA UMANA

Direttore della Scuola : Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Coordinatore d'indirizzo: Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Supervisore :Ch.mo Prof. Claudio Grandi

Dottoranda : Deborah Bridi

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
1. L'EMATOPOIESI	7
2. LA NICCHIA EMATOPOIETICA NORMALE	15
3. LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	19
3.1. Leucemia Promielocitica Acuta (APL o AML sottotipo M3)	24
4. LA LEUKEMIC STEM CELL E LA NICCHIA NEOPLASTICA	26
5. ADRENOMEDULLINA	30
SCOPO DELLA TESI	43
MATERIALI E METODI	45
1. COLTURE CELLULARI	45
2. PEPTIDI	45
3. SAGGI DI CRESCITA	46
4. CARATTERIZZAZIONE GENICA DEL SISTEMA ADRENOMEDULLINICO MEDIANTE RT-PCR: REAZIONE DI RETROTRASCRIZIONE E POLIMERIZZAZIONE A CATENA	47
4.1. Estrazione di mRNA	47
4.2. Quantificazione spettrofotometrica di RNA	48
4.3. Trattamento dell'RNA con RQ1 Rnase Free Dnase	48

4.4. Reazione di retrotrascrizione	48
4.5. PCR: Reazione Polimerasica a Catena	49
4.6. Elettroforesi su gel di agarosio	50
5. CARATTERIZZAZIONE PROTEICA DEL SISTEMA ADRENOMEDULLINICO MEDIANTE WESTERN BLOTTING	51
5.1. Estrazione delle proteine	51
5.2. Quantificazione proteica	51
5.3. Analisi mediante Sodio Dodecil Solfato Poliacrilammide Gel Elettroforesi (SDSPAGE)	52
5.4. Immunoblotting	53
5.5. Rivelazione	53
6. CITOFUORIMETRIA	54
6.1. Studio dell'immunofenotipo	54
6.2. Basi teoriche della CFM	54
6.3. Principio di funzionamento della CFM	55
6.4. Analisi di citometria	57
7. REAL TIME PCR	58
RISULTATI E DISCUSSIONE	63
CONCLUSIONI	81
BIBLIOGRAFIA	83

RIASSUNTO

L'outcome della leucemia mieloide acuta (AML) non ha subito significativi miglioramenti nonostante la sempre più accurata descrizione dei meccanismi patogenetici che sottendono la trasformazione neoplastica della cellula staminale ematopoietica. Il blocco maturativo è caratteristica distintiva di tutte le leucemie acute e verosimilmente la presenza di una quota minoritaria di cellule a fenotipo più immaturo è responsabile di chemoresistenza e ricadute. La prospettiva di poter utilizzare strategie farmacologiche volte a superare il blocco differenziativo, incoraggiata dal successo ottenuto nella leucemia acuta promielocitica (APL) con l'introduzione nei protocolli di terapia dell'acido all-trans retinoico (ATRA), diventa alquanto attraente.

Evidenze sperimentali suggeriscono che i peptidi derivati da adrenomedullina (ADM) giocano un ruolo importante nella regolazione di processi cellulari, quali la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi cellulare. Sintetizzata e secreta da numerosi tipi cellulari, quali cellule epiteliali, neuroni, cellule endoteliali, ADM è stata anche rilevata nel terreno condizionato di granulociti, linfociti, monociti e macrofagi.

Nel presente studio, l'effetto indotto da ADM e dal suo inibitore Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ è stato valutato in vitro a differenti intervalli di tempo su cellule HL60, una linea cellulare umana stabilizzata di APL, mediante saggi di crescita e analisi citofluorimetrica.

Collettivamente, i risultati raccolti in questa tesi suggeriscono un possibile coinvolgimento di ADM nella patogenesi di forme leucemiche e/o nel mantenimento del blocco differenziativo caratteristico di tali patologie. Nelle cellule HL60, il sistema adrenomedullico appariva in

grado di autoregolarsi mediante un controllo della secrezione di ADM, dell'espressione dei suoi recettori e di geni, quali il Cul5. Inoltre, l'espressione di ADM era correlata ad una stimolazione della proliferazione cellulare e ad una inibizione della formazione di fenotipi maturi. Tali effetti venivano annullati o reversati in seguito al blocco del recettore. Sulla base di tali evidenze, si può ipotizzare che la modulazione del sistema adrenomedullinico possa rappresentare una possibile strategia terapeutica per il trattamento delle forme leucemiche.

PAROLE CHIAVE: Leucemia Mieloide Acuta, Leucemia Promielocitica Acuta, Adrenomedullina, ADM-FragmentInhibitor²²⁻⁵².

ABSTRACT

The outcome of acute myeloid leukemia (AML) has not undergone significant improvements despite an increasingly accurate description of the pathogenetic mechanisms underlying the malignant transformation of hematopoietic stem cell. The block maturation is distinctive of all acute leukemias and possibly the presence of a minority of cells more immature phenotype is responsible for chemoresistance and relapse. The prospect of using pharmacological strategies to overcome the differentiation block, encouraged by the success achieved in acute promyelocytic leukemia (APL) with the introduction in therapy protocols of all-trans retinoic acid (ATRA), it becomes very attractive.

Experimental evidence suggests that peptides derived from adrenomedullin (ADM) play an important role in the regulation of cellular processes, such as proliferation, differentiation and apoptosis. Synthesized and secreted by many cell types, such as epithelial cells, neurons, endothelial cells, ADM was also detected in the conditioned medium of granulocytes, lymphocytes, monocytes and macrophages. In the present study, the effect induced by ADM and its specific inhibitor Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ was evaluated in vitro in different intervals of time on HL60 cells, an established human cell line of APL, by growth assays and analysis flow cytometric.

Taken together, our results suggest an involvement of ADM in the pathogenesis of leukemias and/or in the maintenance of differentiative impairment typical of these diseases. In HL60 cells, ADM system modulated itself through ADM secretion, exposure of its receptors and control of gene expression (Cul5). Furthermore, ADM expression was related to the increase in cell proliferation and the inhibition of cell differentiation. These effects were abolished or reversed by using a receptor antagonist.

On this basis, it can be hypothesized that the modulation of ADM system could represent a potential therapeutic approach for the treatment of leukemias.

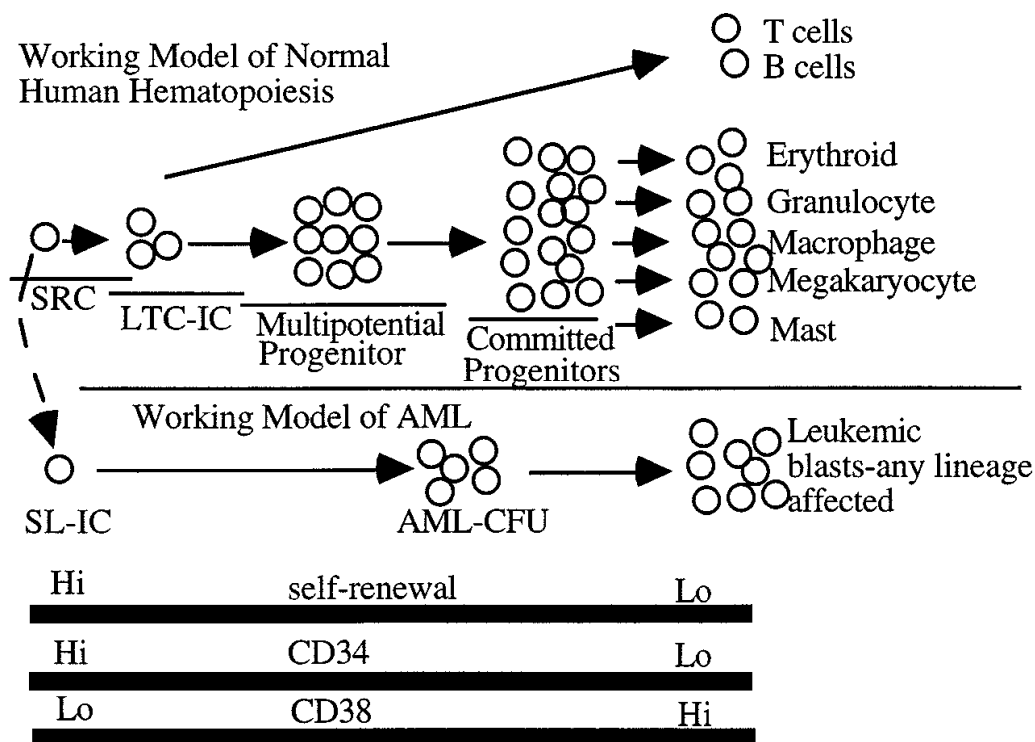
Key-words: Acute Myeloid Leukaemia, Acute Promyelocytic Leukemia, Adrenomedullin, ADM-Fragment Inhibitor²²⁻⁵².

INTRODUZIONE

Le leucemie mieloidi acute (AML) sono un gruppo eterogeneo di patologie oncoematologiche che originano dalla trasformazione clonale di una cellula ematopoietica mediante acquisizione di riarrangiamenti cromosomici e mutazioni geniche multiple (Betz and Hess, 2010).

Il loro *outcome* non ha subito significativi miglioramenti nonostante la sempre più accurata descrizione dei meccanismi patogenetici che sottendono il processo di formazione neoplastica.

Il blocco maturativo, caratteristica distintiva di tutte le leucemie acute, si associa verosimilmente ad una quota minoritaria di cellule neoplastiche a fenotipo più immaturo (*Leukemic Stem Cell*) responsabili della ripresa della malattia e della chemoresistenza dopo induzione di remissione completa (Dick, 1996).



Rappresentazione schematica di un sistema di ematopoiesi umano.

Le *Leukemic Stem Cell* sono una piccola sottopopolazione presente nel *bulk* tumorale dotata di proprietà di autorinnovamento, capacità di organizzazione gerarchica e di asservimento della nicchia stromale a supporto del proprio metabolismo e della modulazione dei segnali che regolano al suo interno la divisione cellulare neoplastica.

Le interazioni tra microambiente e cellula staminale leucemica, mediate da citochine, recettori e molecole di adesione, regolano molti fenomeni biologici e di progressione neoplastica, quali l'*homing*, la sopravvivenza, la differenziazione, la proliferazione e la selezione clonale (Scadden, 2007).

Questa nuova concezione patogenetica delle leucemie, definita in letteratura come il paradigma delle LSC, sta modificando profondamente le strategie terapeutiche antitumorali. La terapia citotossica convenzionale fino ad oggi utilizzata riduce la massa tumorale, ma non eradica le cellule staminali leucemiche, rendendo quindi possibile la ricrescita tumorale e determinando la ricaduta dei pazienti dopo un periodo più o meno lungo. Al contrario gli agenti che eliminano selettivamente le LSC, pur non inducendo una rapida riduzione della massa tumorale, esauriscono nel lungo termine la progressione neoplastica (Bernasconi, 2010).

L'acquisizione di nuove conoscenze sulle alterazioni metaboliche associate alla trasformazione tumorale, conseguenti alla perdita di recettori fenotipici e di segnali di traduzione, sono condizione indispensabile per lo sviluppo di terapie innovative selettivamente dirette all'eliminazione delle LCS, il vero bersaglio per la cura delle leucemie mieloidi.

Tra le famiglie di peptidi regolatori, i peptidi derivati dalla pro-adrenomedullina (pro-ADM) potrebbero svolgere un ruolo chiave e fornire il *target* per nuove e più efficienti strategie terapeutiche.

I peptidi pro-Adrenomedullinici sono dei vaso-modulatori, quasi ubiquitariamente espressi nei tessuti (Yanagisawa et al., 1988; Kitamura et al., 1993). Recenti ricerche hanno dimostrato che tali

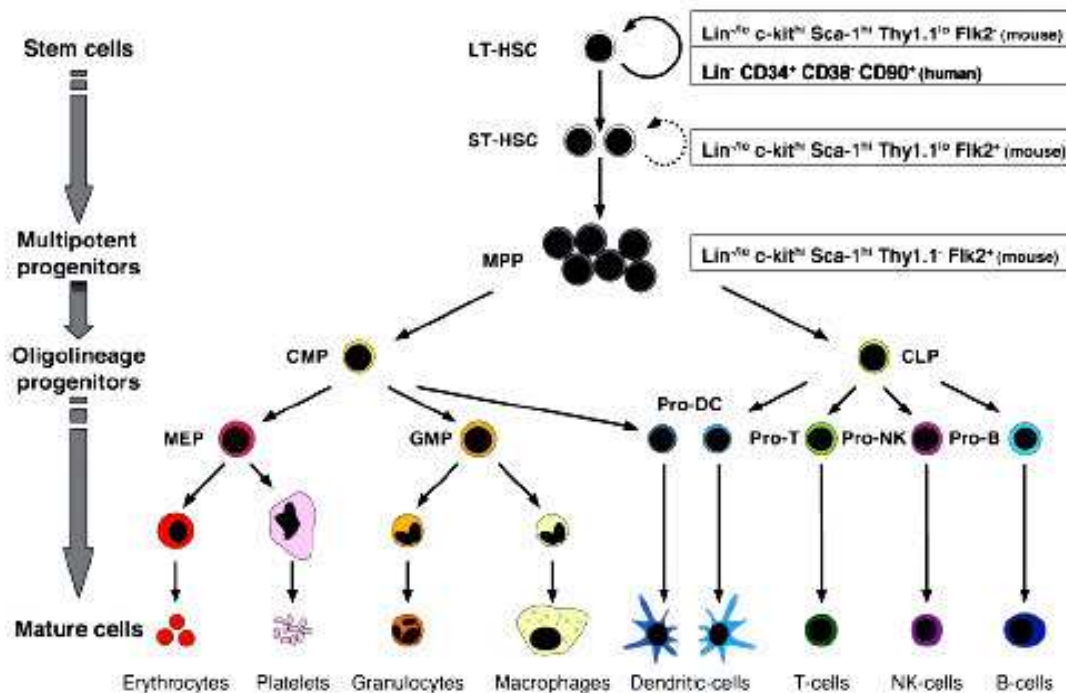
peptidi, accanto ai noti effetti emodinamici, esercitano attività pleiotropiche sulla proliferazione cellulare, differenziazione e apoptosi e sono coinvolti in numerosi fenomeni patogenetici tra cui la progressione e l'invasività nei tumori solidi (Hinson et al., 2000; Belloni et al., 2001; Fillipatos et al., 2001; Pirtskhalaishvili et al., 2001).

Recentemente è stato dimostrato che ADM viene secreta con *loop* autocrini nelle CFU (Del Pup et al., 2003); inoltre sinergizza in *vitro* l'azione espansiva esercitata sui progenitori ematopoietici cordonali da *cocktail* citochinici (De Angeli et al., 2004).

Sebbene il ruolo svolto da ADM non sia stato ancora esplorato nella patogenesi della AML, i dati sopra esposti consentono di ipotizzare un loro coinvolgimento nella malattia leucemica.

1. L'EMATOPOIESI

L'ematopoiesi è il processo attraverso il quale una ristretta popolazione di cellule capostipiti origina i precursori e le forme terminali delle filiere differenziative mieloidi, linfoidi, eritroidi e megacariocitiche, mediante un sistema intermedio, altamente gerarchizzato, di progenitori clonogenici *committed* con differenti capacità proliferative ed espansive.



Differenziazione e maturazione della cellula staminale ematopoietica

L'esistenza delle cellule staminali ematopoietiche capostipiti (cellule staminali ematopoietiche o HSC) è stata ipotizzata per la prima volta nel 1961 da Till e McCulloch a seguito dei loro pionieristici studi sulla rigenerazione del sistema ematopoietico *in vivo* in modelli murini. Tali studi hanno documentato come le HSC siano caratterizzate funzionalmente dalla capacità di autorinnovamento, dalla multipotenza del proprio spettro differenziativo e dall'elevato potenziale proliferativo.

La successiva introduzione dei saggi di crescita delle LTC-IC (Long Term Culture-Initiating Cell), delle CAFC-a (Cobblestone Area-Forming Cell assay) e delle CFU-BL (Colony Forming Unit-Blast), in grado di generare *in vitro* elementi morfologicamente indifferenziati capaci di automantenimento, di formare colonie secondarie e di differenziarsi nelle diverse filiere maturative ematopoietiche, hanno confermato l'esistenza e le proprietà funzionali delle HSC (Sutherland et al., 1989; Sutherland et al., 1990; Ploemacher et al., 1989).

La citofluorimetria a flusso multiparametrica e le tecniche di isolamento immunomagnetico dei subset più primitivi hanno consentito di caratterizzare il fenotipo delle HSC. Attualmente in letteratura è accettato che la maggior parte di tali cellule esprimano l'antigene CD34, presentino elevati livelli di MDR, non esprimano marker di commissionamento (Lin^-) e siano $\text{Thy-1}^{\text{low}}$, CD38^- , CD45RA^- e $\text{Rh-123}^{+/-}$ (Carlo-Stella et al., 1995).

Altri marcatori sono stati proposti per la definizione delle HSC più primitive, quali il CD133 (Miraglia et al., 1998), che rappresenta l'omologo umano della glicoproteina transmembrana prominin 5, il c-kit (Bhatia, 2001) e il Vascolar Growth Factor-R 2, conosciuto anche come KDR, identificato nel subset $\text{CD34}^+\text{CD38}^-\text{CD90}^+\text{CD117}^{\text{low}}$ (Ziegler et al., 1999) ad attività SRC (NOD/SCID Mouse Repopulating Cell) CAFc e E-LTC-IC (Extend LTC-IC).

Comunque, è stata documentata anche l'esistenza di *subset* $\text{CD34}^-\text{Lin}^-$ con capacità di popolamento a lungo termine (LTR) in xenotrapianti, capostipiti delle cellule $\text{CD34}^+\text{CD38}^-\text{Lin}^-$ (Zanjani et al., 1997).

I saggi di crescita clonogenica sviluppati da McNiece et al. (1989) e da Moore (1991) indicano la presenza, immediatamente a valle delle HSC, di *subset* cellulari ad elevato potenziale proliferativo (HPP-CFU) con caratteristiche fenotipiche e funzionali intermedie tra la cellula staminale pluripotente e i progenitori ematopoietici.

Nel midollo osseo le HSC e le HPP-CFU possono generare, attraverso il fenomeno di commissionamento, progenitori multipotenti simili ai CMP (Common Myeloid Progenitor) e ai CLP (Common Lymphoid Progenitor) documentati nel topo.

Secondo Ogawa (1993), la decisione di una cellula capostipite di autoreplicarsi o di commissionarsi selezionando uno di questi due specifici *pathway*, dipende da *input* stocastici di origine genetica. Altri *input* proliferativi, questa volta di origine ambientale, consentono ai progenitori multilinea di assumere potenzialità più ristrette e orientate verso le singole filiere maturative (progenitori oligo, bi e monopotenti).

Parallelamente al restringimento delle potenzialità proliferative, decrescono le capacità di autorinnovamento, mentre aumenta l'espansione clonale a seguito di divisioni cellulari maturative.

I progenitori *committed* sono cellule che crescono bene in terreni semisolidi (agar/metilcellulosa), dove generano colonie con peculiari caratteristiche morfologiche che le rendono identificabili al microscopio. La colonia capostipite mieloide viene considerata la CFU-GEMM o CFU-Mix, essendo costituita da elementi cellulari con potenzialità maturative non ristrette, capaci di generare a loro volta colonie formate da cellule granulocitarie, eritroidi e megacariocitiche (Fause et Messner, 1979; Ghio, 1989).

La cellula CFU-GM è il progenitore comune alle linee granulocitaria, monocitaria e, a seconda delle citochine presenti nel terreno di coltura, origina colonie costituite da piccole cellule di tipo granulocitario o colonie monocitarie formate da un minor numero di cellule, ma di grandi dimensioni.

I progenitori commissionati in senso eritroide, in presenza di EPO (Eritropoietina), presentano tassi di crescita "esplosivi" e producono le colonie precoci di BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) costituite da cellule emoglobinizzate. In assenza di questo ormone, originano colonie più tardive CFU-E composte da ammassi di eritroblasti ben differenziati.

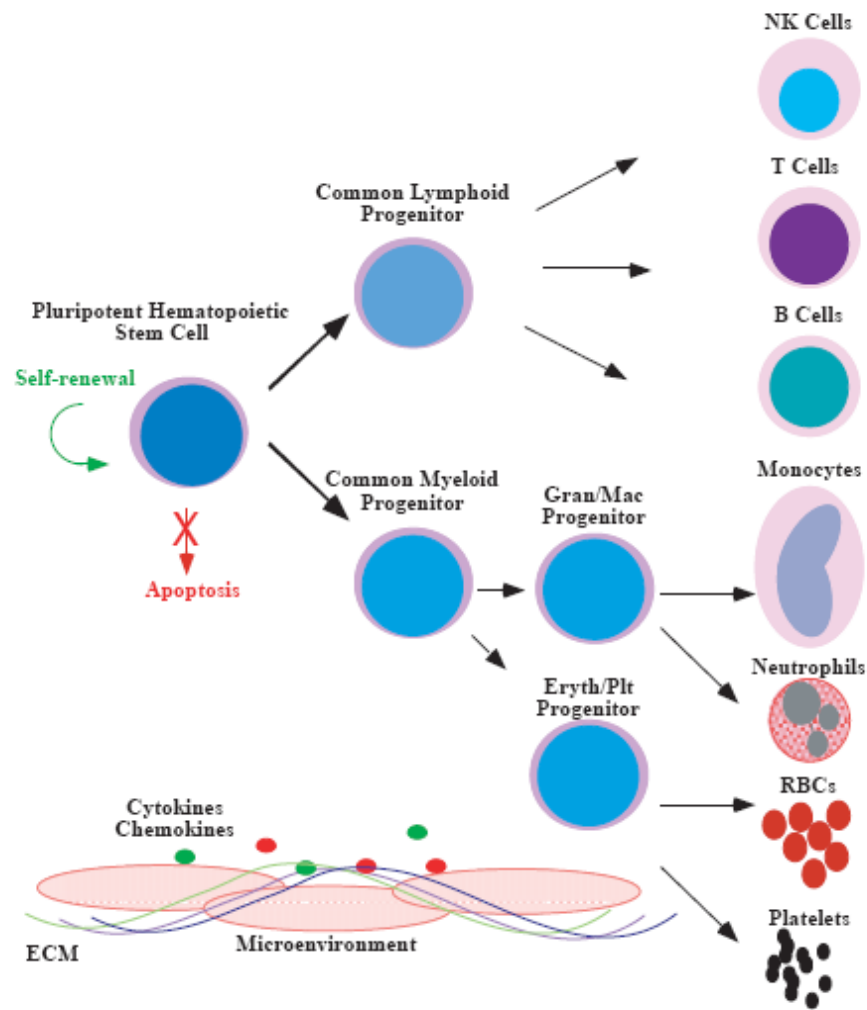
Le CFU-Meg sono progenitori megacariocitari coltivabili in metilcellulosa o su coagulo di plasma in colonie formate da poche e voluminose cellule.

Anche i progenitori *committed* sono stati ampiamente studiati mediante citofluorimetria. Allo stadio di CFU-Mix, fa la sua comparsa il marcatore mieloide specifico CD33. Questo *marker* viene mantenuto fino alle fasi finali del differenziamento, ma si trova anche debolmente espresso a livello dei monociti maturi. In ultimo compaiono gli antigeni CD13 e CD15, acquisiti specificamente dalle cellule mieloidi allo stadio CFU-GM e mantenuti per il restante percorso maturativo.

Complessivamente, gli studi fino a oggi condotti hanno permesso di associare alla filiera T-linfocitaria i marcatori TdT, CD10, CD7, CD5 e CD2, a quella B-linfocitaria TdT, CD10, CD19, a quella mieloide TdT, CD33, CD13, CD15, a quella megacariocitica CD61, CD41, CD42a, e a quella eritrocitaria CD36 e CD71.

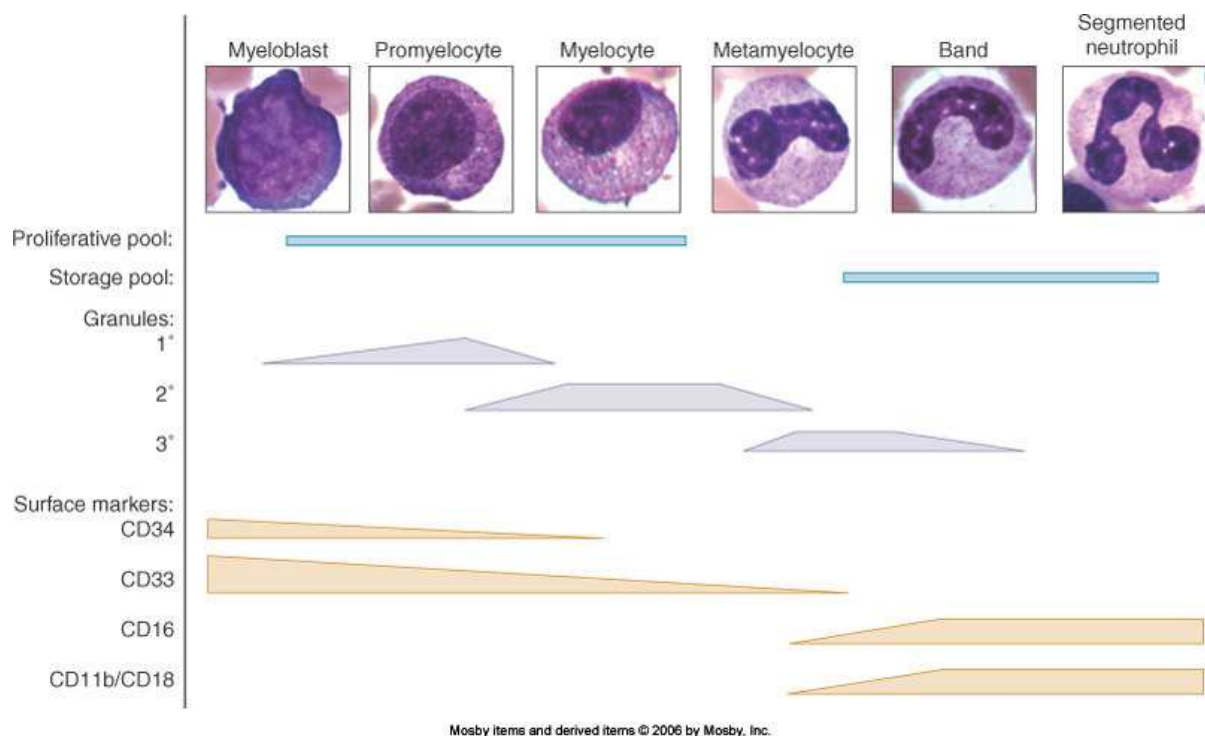
La maggior parte delle cellule del midollo osseo sono costituite da precursori. Queste cellule presentano caratteristiche morfologiche nucleari e citoplasmatiche, fenotipiche e funzionali che consentono una loro classificazione nelle differenti filiere maturative (Smith, 2003).

In particolare nella filiera granulocitaria il primo precursore identificabile microscopicamente è il Mieloblasto, cellula ad alto rapporto nucleo/citoplasma, nucleolo prominente e ridotta granulosità citoplasmatica. Ad esso segue lo stadio Promielocita, contraddistinto dall'acquisizione di granuli primari contenenti numerose proteine antibatteriche. L'ultimo stadio differenziativo dotato di capacità proliferativa è costituito dal Mielocita: la cellula acquisisce granuli secondari che le conferiscono le caratteristiche colorazioni in grado di distinguerle, alla microscopia ottica, da eosinofili e basofili.



Differenziamento delle cellule del sangue

L'acquisizione dei granuli terziari contenenti gelatinasi, è appannaggio dei successivi stadi maturativi, Metamielocita e *Band Cell*. Il neutrofilo segmentato rappresenta la tappa finale dell'intero processo di maturazione.



Granulopoiesi

I precursori, pertanto, presentano scarsa capacità di automantenimento, ma a causa della loro elevata numerosità e di una notevole attività mitotica aumentano considerevolmente il loro numero assoluto. Conseguentemente, passando da una *stem cell* ad elementi funzionalmente differenziati, le cellule più primitive hanno la capacità di generare una progenie enorme.

L'equilibrio tra il *self-renewal* e la differenziazione terminale, garantisce l'omeostasi ematopoietica. Se una cellula staminale è indotta a differenziare i geni preposti al *self-renewal* vengono *down-regolati* e contemporaneamente i geni che determinano l'acquisizione di una specifica identità funzionale vengono *up-regolati* (Young et al., 2006).

I fenomeni che sono alla base di tale *switch* sono ancora in gran parte oscuri. Si ritiene, comunque, che possano esistere sia meccanismi di regolazione intrinseci, basati sull'espressione di specifici geni *pivot* a monte della regolazione genica del *self-renewal*, sia meccanismi di

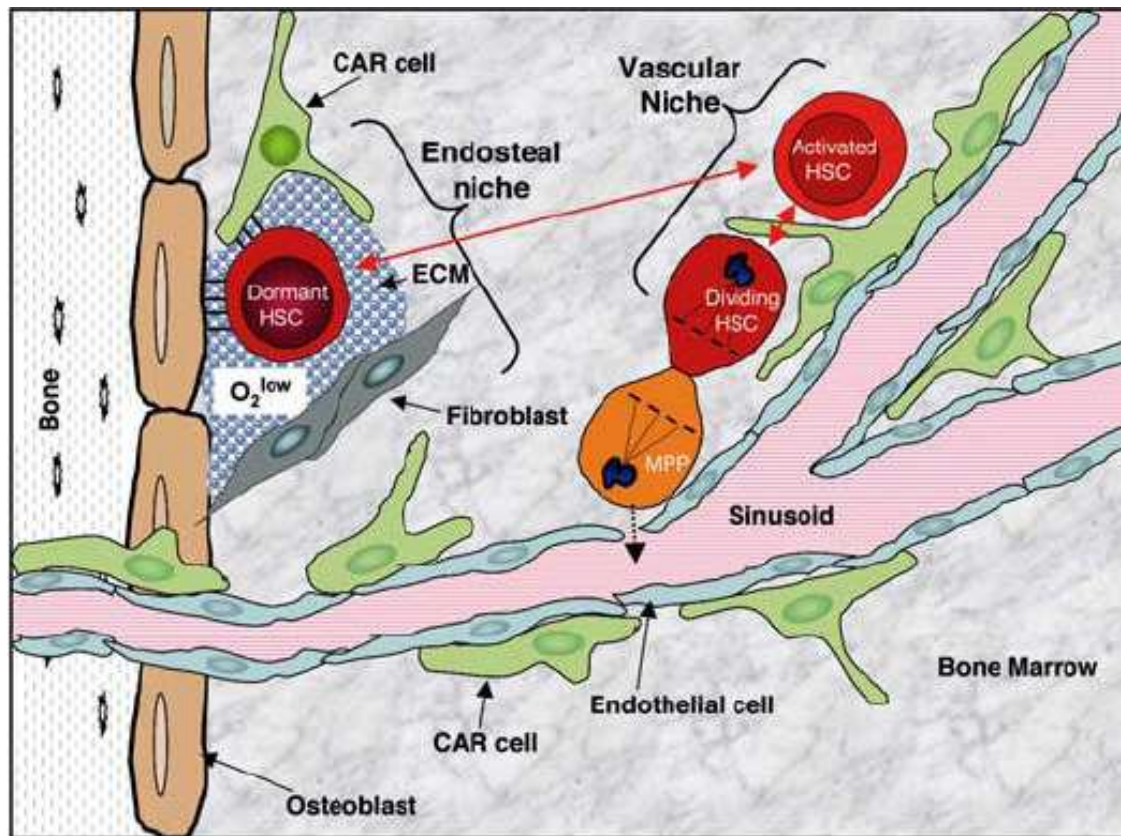
regolazione estrinseci, costituiti da segnali e molecole modulatorici provenienti dall'ambiente extracellulare (Smith, 2003).

I segnali extracellulari che modulano la proliferazione e la differenziazione delle HSC provengono principalmente dalla componente stromale del midollo osseo, caratterizzata da una struttura lassa, costituita da una delicata matrice extracellulare di origine connettivale, da cellule stromali e da un complesso sistema vascolare che fa da supporto al parenchima ematopoietico.

Probabilmente i segnali microambientali e di regolazione dell'ematopoiesi meglio caratterizzati sono le citochine, una grande ed eterogenea famiglia di fattori induttivi solubili. Questi peptidi, legandosi a specifici recettori espressi sulla superficie cellulare, attivano un'ampia gamma di *pathway* metabolici e di secondi messaggeri implicati nella modulazione dello stato di quiescenza, proliferazione e differenziazione delle cellule ematopoietiche stesse (Janowska-Wieczorek et al., 2001; Smith, 2003).

In base alle loro cellule *target* e al loro differente potenziale induttivo è possibile dividere le citochine in tre grandi categorie funzionali: la prima comprende citochine ad azione induttiva precoce che concorrono al *reawakening* delle cellule pluri/multi potenti quiescenti, la seconda è costituita da citochine filiera-indipendenti esplicanti un'azione proliferativa e differenziativa intermedia sui progenitori *committed*, la terza è composta da citochine filiera-dipendenti che agiscono sull'ematopoiesi tardiva inducendo la maturazione dei precursori in elementi ematici terminali (Consolini et al., 2001).

Al contrario il *self-renewal* è principalmente regolato dall'interazione diretta HSC e cellule stromali ed endoteliali costituenti la nicchia ematopoietica.



La nicchia ematopoietica

Successivi studi hanno confermato la sua esistenza dimostrando che il numero della HSC in essa residenti è ben definito e regolato da un complesso *network* di segnali inibenti in equilibrio fra loro (Stier et al., 2005; Calvi et al., 2003). All'interno della nicchia tali segnali bidirezionali sono critici per il mantenimento quiescente a lungo termine del pool HSC (Fleming et al., 2008).

Anche la funzionalità staminale è mantenuta grazie all'interazione tra HSC e cellule stromali poiché l'introduzione di cellule differenziate nella nicchia ne fa revertare il fenotipo ripristinando la staminalità (Adams e Scadden, 2006).

La nicchia fornisce, pertanto, un microambiente protetto che mantiene intatta la riserva di HSC impedendo loro di entrare in contatto con stimoli differenziativi o pro-apoptotici. Inoltre, regolando la

proliferazione impedisce la sovrapproduzione cellulare che potrebbe originare neoplasie.

Sono noti due tipi di nicchia strettamente correlate tra di loro: quella osteoblastica (endosteale) e quella vascolare (Perry e Li, 2007).

La nicchia endosteale è definita anatomicamente dall'immediata prossimità all'osso trabecolare o corticale e può essere riprodotta *in vitro* con tecniche di co-cultura con osteoblasti (Mayack and Wagers, 2008; Mukherjee et al., 2008; Nilsson et al., 2001). Ospita HSC CD150⁻ quiescenti, lentamente ciclanti ed in grado di garantire l'ematopoiesi a lungo termine.

Le dimensioni della nicchia endosteale sono strettamente regolate dalla *proteina paratormone correlata* che, determinando l'espressione di Jagged-1 (ligando di Notch-1), induce gli osteoblasti N-cadherina⁺/CD45⁻ a proliferare e le HSC ad automantenersi mediante un fine meccanismo omeostatico basato sull'interazione N-caderina/ β -catenina tra questi due citotipi cellulari. La rottura di tale legame ad opera di metallo proteasi provoca nelle HSC un accumulo di β -catenina intracitoplasmatica con conseguente attivazione delle vie metaboliche di Wnt necessarie per lo *start-up* dei programmi differenziativi delle cellule ematopoietiche e per la loro espansione clonale multi-linea (Scadden, 2007). Al contrario, l'induzione delle vie metaboliche di Notch-1 sembrano determinati per il mantenimento della staminalità.

La nicchia vascolare è una struttura a diretto contatto con la superficie sinusoidale, costituita da cinque *layer* di Cellule Avventiziali Reticolari (CAR o periciti) che circondano le HSC, come dimostrato dagli studi di Kiel et al. (2005), con metodi d'immunofluorescenza *in vivo*.

Le CAR, che per le loro proprietà di automantenimento e per la loro capacità di transdifferenziarsi in osteoblasti, condrociti ed adipociti si identificano nella cellula mesenchimale staminale, producono Angiopietina-1 (Ang-1) ed esprimono il CD146 e il CXCL12 (Stromal – derived factor-1, SDF-1). Quest'ultimo favorisce l'homing delle HSC nella nicchia inducendole ad esprimere il *Vascular Cell Adhesion*

Molecole-1 (VCAM) e il *Very Late Antigen-4* (VLA-4). L'Ang-1 legandosi al proprio recettore Tie-2 ad attività tirosin-chinasica, induce la quiescenza delle HSC attraverso un meccanismo ancora non conosciuto.

La stretta cooperazione tra le due nicchie è regolata da gradienti di ossigeno e di Fibroblastic Growth Factor 4 (FGF4). Il loro incremento induce la proliferazione ed il passaggio delle HSC dalla nicchia endosteale alla nicchia vascolare e successivamente al circolo. Al contrario, il decremento dei livelli di ossigeno e di FGF4 inducono la migrazione transendoteliale delle HSC dal circolo alla nicchia vascolare e da qui a quella endosteale.

Il passaggio delle HSC quiescenti con fenotipo $CD150^-CD34^-CD38^-Lin^-$ dalla nicchia endosteale alla nicchia vascolare si accompagna ad un'attivazione della proliferazione e delle *routine* cellulari differenziative con acquisizione del fenotipo più maturo $CD150^+CD34^+CD38^-Lin^-$ tipico dei progenitori multipotenti (Wilson et al., 2007).

Alla costituzione di entrambe le nicchie partecipano anche le altre cellule stromali del midollo osseo, quali gli osteoclasti, le cellule endoteliali, gli adipociti e le cellule dello stroma midollare, che, attraverso la produzione di citochine, chemochine e segnali intracellulari, a loro volta prodotti da fenomeni di adesione cellulare, svolgono un ruolo importante per la normale omeostasi midollare (Morrison e Spradling, 2008).

In particolare, gli osteoclasti giocano un ruolo importante nella mobilizzazione delle HSC (Calvi et al., 2003). Segnali di regolazione, inoltre, sono prodotti da componenti della matrice extracellulare, quali l'osteopontina e dagli ioni nei fluidi extra-cellulari (in particolare lo ione calcio) presenti nel microambiente (Adams e Scadden, 2006).

3. LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

Le leucemie mieloidi acute (AML) costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie neoplastiche clonali caratterizzate da un'abnorme produzione di cellule della linea granulo-monocitaria e originano da alterazioni genetiche od epigenetiche del genoma di una HSC o di un progenitore *committed*, causandone l'anormale differenziazione e l'acquisizione di un *self-renewal* disregolato.

Le AML rappresentano il 30% di tutte le leucemie dell'adulto. Ogni anno in Europa sono diagnosticati circa 18.000 nuovi casi, lo 0.6% di tutti i tumori. Le AML sono meno comuni delle leucemie linfatiche croniche, ma risultano essere cinque volte più frequenti al di sopra dei 50 anni di età. Infatti più del 30% dei pazienti colpiti ha un'età superiore a 60 anni (Pinto et al., 2001).

Le AML si distinguono sul piano biologico, clinico e prognostico, in tre categorie. Le AML primarie o *de novo*, compaiono acutamente in soggetti per i quali non è dimostrabile un'esposizione significativa ad agenti leucemogeni. Le AML secondarie ad esposizione nota ad agenti leucemogeni insorgono come secondo tumore in soggetti precedentemente trattati con chemioterapia per una pregressa neoplasia.

Altre AML sono secondarie a una precedente sindrome mielodisplastica della quale costituiscono l'evoluzione. Il quadro clinico delle AML dipende da una insufficiente e difettiva produzione di cellule ematiche mature (eritrociti, granulociti neutrofilii e piastrine), infiltrazione dei tessuti e degli organi non emopoietici da parte delle cellule leucemiche (organomegalia), liberazione, in parte dalle stesse cellule leucemiche e in parte dalle cellule del sistema linfatico e monocitomacrofagico, di mediatori chimici (citochine). Il tempo che intercorre fra i primi sintomi e la diagnosi va da 2-3 settimane a 2-3 mesi. Quando la storia pre-diagnosi è più lunga, spesso si tratta di una AML secondaria ad una sindrome mielodisplastica e non di una

AML insorta *de novo*. L'insufficiente produzione di eritrociti si manifesta con i sintomi dell'anemia, mentre l'insufficienza piastrinica si concretizza in manifestazioni emorragiche come porpora, ecchimosi, epistassi o ipermenorrea.

L'insufficiente produzione di granulociti neutrofili è causa di infezioni, che inizialmente sono quasi sempre batteriche e localizzate prevalentemente al cavo orale ed all'orofaringe, all'apparato respiratorio e alla cute. A questi sintomi se ne possono associare di generali, secondari all'espansione della massa leucemica e alla liberazione di mediatori chimici dell'infiammazione: dolori ossei e muscolari, sudorazioni profuse, calo ponderale. Relativamente poco frequente è il riscontro di epatomegalia, splenomegalia, linfadenomegalie e interessamento cutaneo. Molto rari sono i segni di interessamento del sistema nervoso centrale o dei nervi cranici (Lezioni di Ematologia di Sante Tura, 2003). La diagnosi di AML si esegue mediante esame emocitometrico e con formula leucocitaria eseguita su sangue periferico e da ago aspirato midollare completato con la biopsia ossea, se il primo è povero o privo di cellule (Löwenberg et al., 1999).

Il riconoscimento delle caratteristiche mieloidi dei blasti leucemici della AML avviene primariamente su base morfologica ed è perfezionato mediante tecniche di immunocitometria con anticorpi monoclonali che riconoscono specifici *marker* di membrana. Rispetto alle sindromi linfoproliferative acute e croniche, nelle AML la fenotipizzazione immunologica riveste un'importanza clinica meno stringente, diventando strettamente necessaria solo nello studio dei casi non facilmente classificabili mediante la morfologia e la citochimica, come ad esempio nella AML con minimi segni di maturazione (M0), i cui i blasti sono perossidasi negativi e non presentano granulazioni (Catovsky, 1992; Bene et al., 1995; Sanz et al., 1996), o nella forma variante della leucemia promielocitica (M3) (Sanz et al., 1996)

Negli ultimi anni è emersa una serie di associazioni tra quadri citomorfologici ed aspetti citogenetici. Nell'ambito di alcuni citotipi è possibile distinguere entità citologiche associate a particolari alterazioni cromosomiche. Le alterazioni citogenetiche possono essere numeriche e/o strutturali e possono essere presenti come anomalie singole o in associazione.

In generale, nel 60% dei pazienti con AML, analisi citogenetiche pre-trattamento rivelano cariotipi anomali. Pertanto, con analisi citogenetiche è possibile identificare sottopopolazioni distinte di AML che richiedono un approccio terapeutico su misura (Grimwade, 2007). Le alterazioni citogenetiche presenti alla diagnosi scompaiono in remissione completa, per riapparire all'eventuale ricaduta con o senza anomalie addizionali.

Analisi rapide citogenetiche identificano pazienti con AML con caratteristiche cariotipiche avverse, che hanno una prognosi particolarmente negativa se trattati con chemioterapia convenzionale (meno del 5% di sopravvivenza a 5 anni) (Grimwade, 2007). Nei bambini e nei giovani adulti è importante distinguere da subito pazienti con alti rischi di ricaduta, per poter passare direttamente alla scelta del trapianto allogenico come terapia elettiva finalizzata ad ottenere la remissione completa.

Comunque, l'utilizzo del cariotipo come strumento di identificazione del rischio presenta numerose limitazioni quali il *failure* delle analisi citogenetiche, la presenza di riarrangiamenti cromosomici criptici e AML con cariotipo normale nel 40% dei casi (Grimwade, 2007).

Nel 2007 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha proposto un nuovo sistema classificativo dei disordini mieloproliferativi che adotta, accanto ai criteri clinici e morfologici della precedente classificazione FAB (Gruppo Cooperativo Franco-Americano-Britannico: vedi Tabella III), caratteristiche immunofenotipiche, citogenetiche e biologico-molecolari: la classificazione WHO (Swerdlow et al., 2008).

SIGLA	CATEGORIA	CRITERI MORFOLOGICI
M0 *	INDIFFERENZIATA	MPO <3% ma mostra granulazioni caratteristiche al microscopio elettronico; NAE negativa
M1	MIELOBLASTICA SENZA MATURAZIONE	Blasti >90% nel midollo esclusi eritroblasti; <10% componente monocitaria; <10% granulociti, MPO >3%
M2	MIELOBLASTICA CON MATURAZIONE	Blasti 30<90%; granulociti >10%; monociti <20% (NE), MPO >3%
M3 **	PROMIELOCITICA (APL)	>20% promielociti anomali ipergranulari (corpi di Auer), MPO>3%;
M3V**	PROMIELOCITICA VARIANTE IPOGRANULARE (APL _v)	Nuclei reniformi, granulazioni fini nel citoplasma, poco visibili al MO, ma MPO +++ , MPO >3%
M4	MIELOMONOCITICA	Blasti >30%, NE componente granulocitaria 20<80%, componente monocitaria 20<80%, >5x10 ⁷ /l monociti nel sangue periferico o lisozima elevato, MPO >3%
M4 eo	MIELOMONOCITICA CON IPEREOSINOFILIA	Criteri per M4 associati a eosinofili anormali con granuli eosinofili e basofili, MPO >3%
M5	MONOCITICA	>80% NE componente monocitaria; NAE positiva
M5a	MONOCITICA SENZA DIFFERENZIAZIONE (MONOBLASTICA)	>80% NE componente monocitaria; monoblasti >80% della componente monocitaria, NAE positiva
M5b	MONOCITICA CON DIFFERENZIAZIONE	>80% NE componente monocitaria; monoblasti <80% della componente monocitaria NAE positiva
M6	ERITROLEUCEMIA	Cellule eritroidi >50% delle cellule midollari; blasti >30% NE
M7***	MEGACARIOBLASTICA	Blasti >30% NE; megacarioblasti, <i>blebs</i> , (mielofibrosi)

Classificazione istochimica-morfologica FAB

Nel 50-60% dei casi di bambini affetti da AML, la malattia può essere classificata come forma M1, M2, M3, M6 o M7, mentre nel restante 40% dei casi la LMA si presenta con i sottotipi M4 o M5. Al contrario, sotto ai due anni di età, circa l'80% delle AML appartengono al sottotipo M4 o M5 a cui si associano riarrangiamenti della banda 11q23 coinvolgenti il gene MLL (Swerdlow et al., 2008).

Le probabilità di una lunga sopravvivenza o di guarigione sono attorno al 25%, ma l'età avanzata del paziente condiziona la prognosi, il decorso e l'atteggiamento terapeutico da tenere.

Inoltre, la capacità dell'organismo di sopportare la terapia antileucemica (chemioterapia di diversa intensità e durata e trapianto di midollo) si riduce con il progredire dell'età. D'altro canto, le AML dell'anziano sono intrinsecamente più resistenti alla terapia antileucemica e hanno caratteristiche cliniche e biologiche più vicine alle AML secondarie che a quelle *de novo*.

L'obiettivo primario del trattamento dei pazienti con l'AML è di raggiungere e mantenere la remissione completa (RC) (Freireich et al., 1961). Per remissione completa si intende una normalizzazione della conta a un valore pari o maggiore di $100 \times 10^9/L$ per le piastrine, di $1.5 \times 10^9/L$ per i leucociti ed una presenza di blasti nel midollo osseo inferiore al 5% (Cheson, 2004). Dopo 3 anni di remissione completa la probabilità di recidiva è inferiore al 10% e i pazienti possono essere considerati potenzialmente guariti (De Lima et al., 1997).

La terapia della AML si basa sulla somministrazione di agenti citotossici finalizzata a ridurre ai minimi termini e, possibilmente, ad eradicare la popolazione leucemica, consentendo alle cellule staminali normali residue di ripopolare il midollo. I farmaci principali sono la Citosina Arabinoside, che può essere usata a dosi standard ($200 \text{ mg/m}^2/\text{die}$ in perfusione continua) o a dosi medio-alte ($1-2 \text{ g/m}^2$ ogni 12-24 ore, per un totale di 6-12 dosi) e le antracicline o similari (Daunomicina, Adriamicina, Idarubicina, Mitoxantrone). Lo schema classico di riferimento è definito 3/7 costituito da un'antraciclina (somministrata per tre giorni) e Citosina Arabinoside in perfusione continua per 7 giorni. Questo schema, variato con la Citosina Arabinoside ad alte dosi e con l'aggiunta o la sostituzione, di volta in volta, degli altri farmaci, viene ripetuto per uno o più cicli per ottenere la remissione.

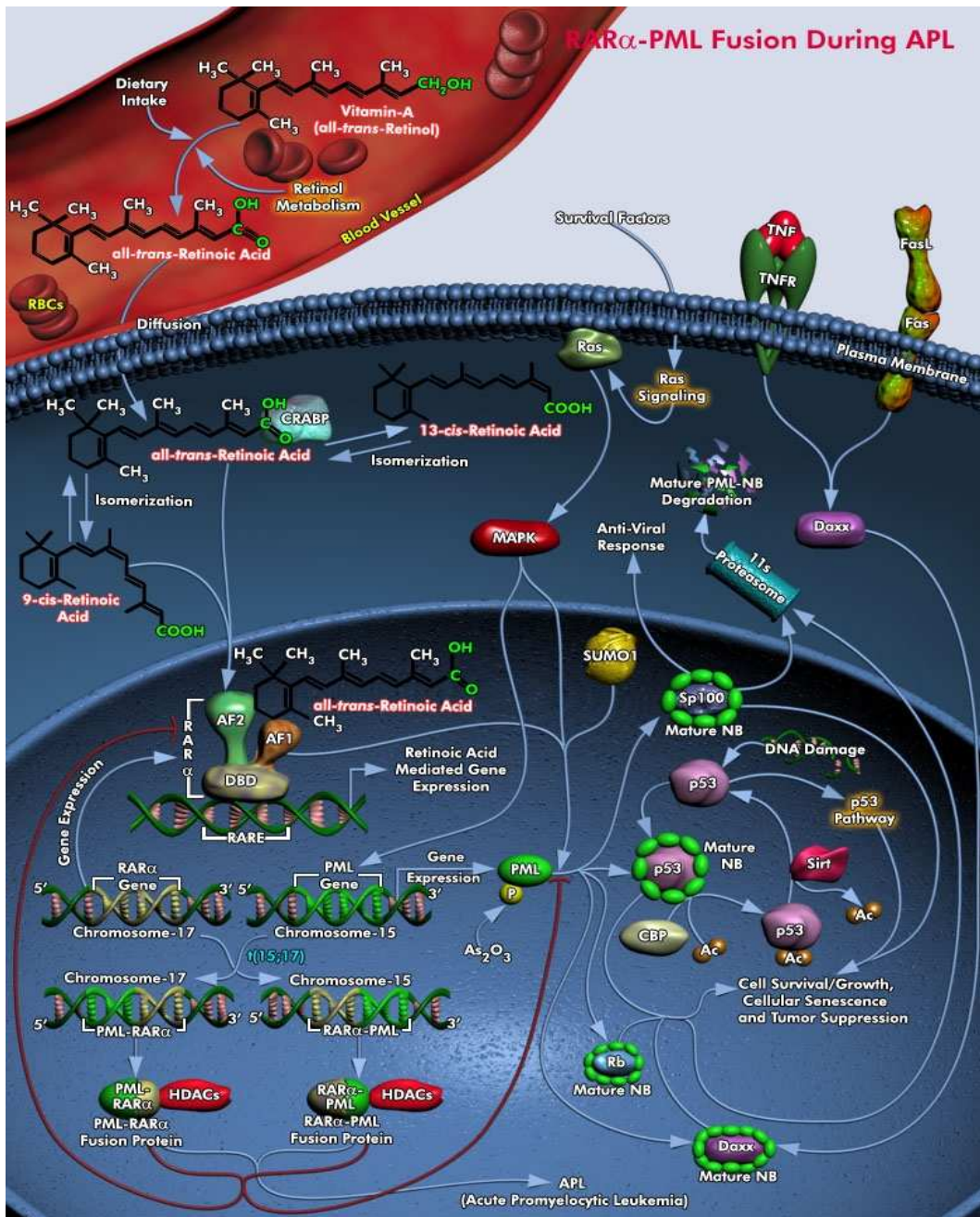
A raggiungimento della remissione completa, l'interruzione delle terapie assicura un periodo libero da malattia variabile tra 6 e 12 mesi e solo il 10-20% dei pazienti sopravvive più di 5 anni. Al contrario, la prosecuzione della polichemoterapia assicura da 8 a 24

mesi di remissione ed una sopravvivenza a cinque anni del 10-30% dei casi. Nel trapianto di midollo autologo la durata media della remissione è, invece, superiore a 24 mesi e il numero di pazienti che sopravvivono oltre i cinque anni incrementa al 30-50% dei casi. Il trapianto di midollo allogenico assicura una remissione superiore ai 24 mesi e una percentuale di sopravvivenza a cinque anni compresa tra il 30 e il 60% dei casi, ma il 10-30% dei pazienti muore a causa degli effetti tossici del trapianto stesso (Lezioni di Ematologia di Sante Tura).

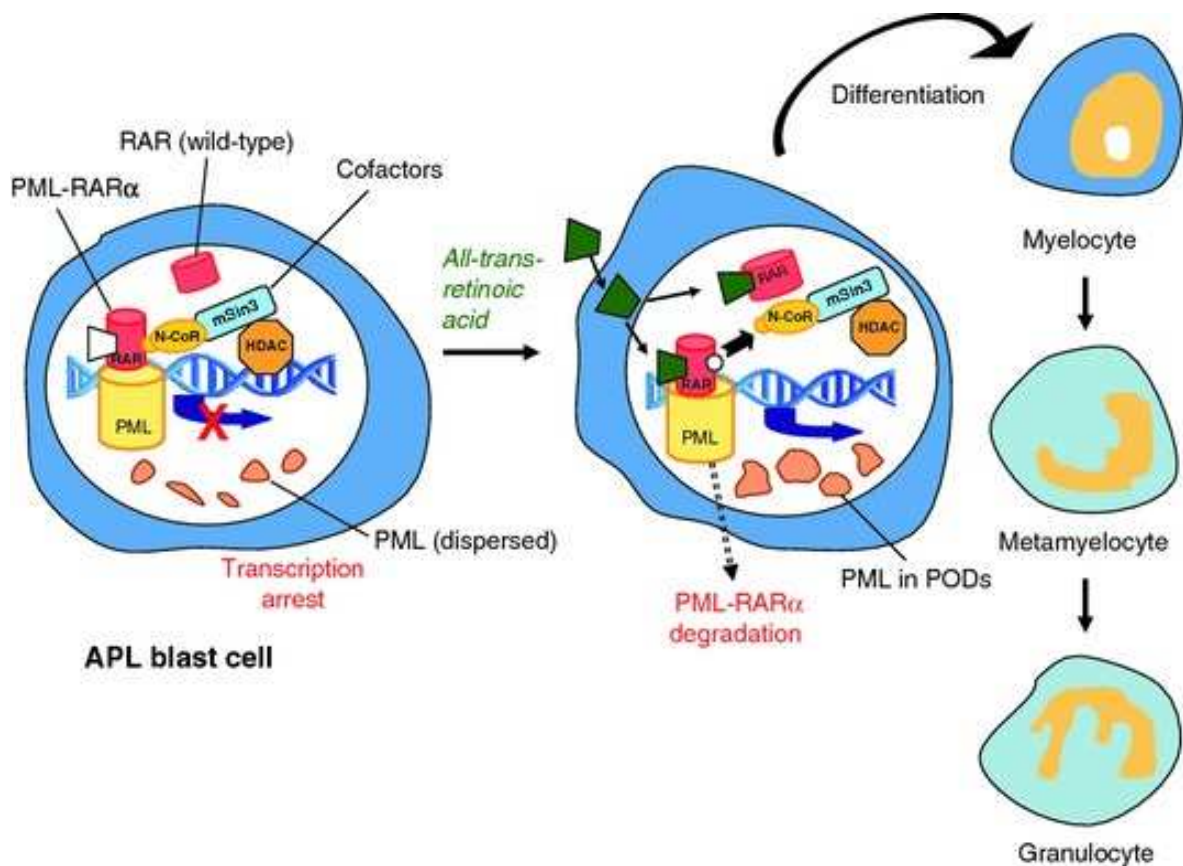
3.1. Leucemia Promielocitica Acuta (APL o AML sottotipo M3)

La Leucemia Promielocitica Acuta (APL) è caratterizzata da una traslocazione cromosomica tra i cromosomi 15 e 17, $t(15;17)(q21;12)$ e porta alla fusione del gene codificato dal recettore dell'acido retinoico alfa ($RAR\alpha$) ad un certo numero di geni alternativi (X), fra i più frequenti i PML (> 95%), PLZF (0,8%) e NPM (0,5%). Negli ultimi anni è stato stabilito che la proteina di fusione X- $RAR\alpha$ gioca un ruolo nella patogenesi di APL attraverso il reclutamento di un co-repressore e di un complesso istone deacetilasi (HDAC) il quale reprime i geni coinvolti nel differenziamento mieloide. Paradossalmente, la proteina di fusione X- $RAR\alpha$, ha il potenziale di mediare il differenziamento mieloide a dosi farmacologiche del proprio ligando, all trans retinoic-acid (ATRA), il quale è dipendente dalla dissociazione del complesso HDAC/co-repressore. Anche i composti a base di arsenico sono stati dimostrati essere promettenti agenti terapeutici portando al differenziamento e all'apoptosi dei blasti di APL. È ora evidente che la natura di $RAR\alpha$ è determinante nella risposta ad ATRA e Triossido di Arsenico (ATO), sottolineando l'importanza della caratterizzazione citogenetica e molecolare di pazienti con APL sospetta per determinare il più appropriato approccio terapeutico. Protocolli standard, che coinvolgono ATRA in combinazione con chemoterapia a base di antracicline, portano alla

cura di circa il 70% dei pazienti con PML-RAR α associata ad APL. In pazienti con alto rischio di recidiva può essere effettuato un monitoraggio che identifichi la malattia minima residua. Con l'avvento di ATRA e ATO in APL è già stato fornito un primo esempio di successo di terapia molecolare mirata (Mistry et al., 2003).



Fusione PML-RAR α durante APL



Rappresentazione schematica degli effetti di PML-RAR e ATRA nei blasti di leucemia promielocitica acuta. Il DNA, legato a PML-RARA interagisce con N-CoR (o SMRT) e recluta il complesso m-Sin3-HD, diminuendo l'acetilazione dell'istone e reprimendo l'organizzazione della cromatina e la trascrizione. L'interazione dell'acido retinoico con PML/RAR porta ad una rapida degradazione di questa proteina di fusione e l'assemblaggio della proteina wild-type PML in normali strutture nucleari chiamate POD (*PML oncogenic domains*). Inoltre, induce la dissociazione del complesso N-CoR-mSin3-HD, il reclutamento di coattivatori con attività acetiltransferasi, l'aumento dei livelli di acetilazione dell'istone, il rimodellamento della cromatina e l'attivazione trascrizionale.

4. LA LEUKEMIC STEM CELL E LA NICCHIA NEOPLASTICA

Si è già riferito che l'ematopoiesi leucemica è la copia dell'ematopoiesi normale con un'organizzazione gerarchica che prevede al vertice una cellula leucemica staminale (LSC) (Bonnet and

Dick, 1997) e a valle sottopopolazioni cellulari con potenziale autoreplicativo limitato.

I *subset* più primitivi delle LSC, similmente ai *subset* staminali normali, hanno fenotipo CD34⁺CD38⁻Thy1⁻ e sono costituiti da cellule per la maggior parte quiescenti, chemoresistenti, dotate di autorinnovamento e tumorigenicità in topi SCID (Several Combined ImmunoDeficiency) e NOD-SCID (Non-Obese Diabetic/SCID).

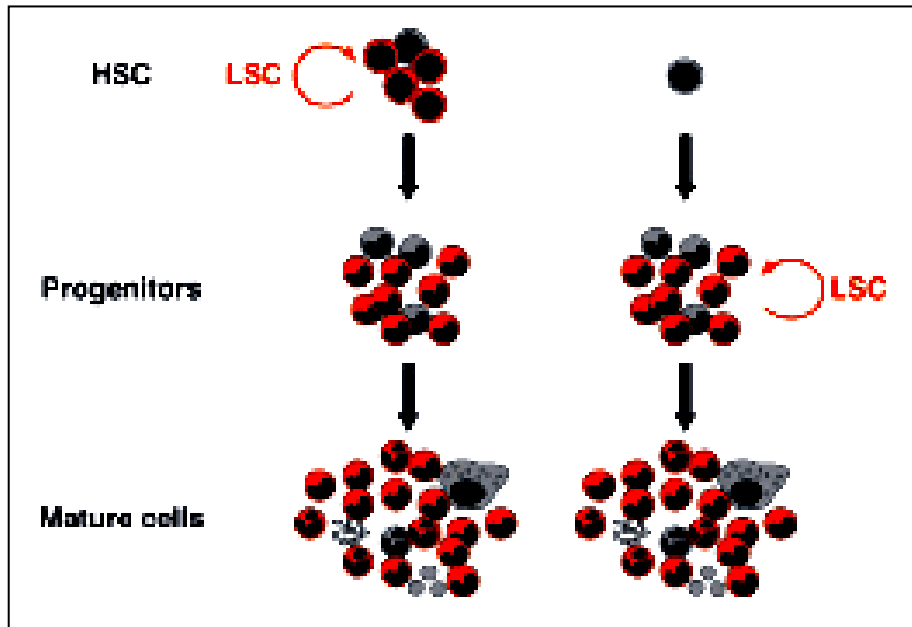
Come per le HSC normali, la loro progenie è composta da popolazioni eterogenee per caratteristiche fenotipiche, capacità proliferative e potenziale leucemiogeno. Esperimenti *in vivo* ed *in vitro* hanno evidenziato che la frequenza delle cellule leucemiogene varia dallo 0.2 all'1% nell'intera popolazione neoplastica, mentre la maggior parte dei blasti costituisce il *bulk* neoplastico caratterizzato da un'aberrante differenziazione, ma incapace di trasferire negli animali da esperimento la leucemia (Dalerba et al., 2007).

Le indagini citogenetiche e di biologia molecolare condotte sulle LSC CD34⁺CD38⁻ Thy1⁻ hanno individuato mutazioni multiple dei domini chinasi, dei fattori di trascrizione e dei geni oncosoppressori. Tali mutazioni sono associate ad alterazioni dei meccanismi di crescita e di sopravvivenza mediati da NF-kappa B (NF-κB) e PI3 chinasi, a modificazioni del metabolismo del glucosio e della risposta agli stress ossidativi.

Al contrario, nella progenie più differenziata segnali epigenetici, quali la modificazione della struttura cromatinica e la deacetilazione degli istoni, sembrano svolgere un ruolo importante nella limitazione del potenziale leucemiogeno e di autorinnovamento.

L'origine delle LSC appare ancora controversa. Poiché la cellula staminale normale e quella leucemica sono accumulate dalle capacità di autorinnovamento e di differenziare in progenie pluriclonale, appare plausibile l'ipotesi che le HSC siano il *target* della trasformazione leucemica che si realizza per l'accumulo progressivo di mutazioni. Comunque, anche cellule prive di *self-renewal* quali i

progenitori *committed* potrebbero essere il *target* di mutazioni leucemogene capaci di riattivare la loro staminalità, come dimostrerebbero gli studi di So et al. (2003).



Origine della cellula staminale leucemica.

Se l'accumulo di mutazioni pro-oncogeniche è la condizione necessaria per il processo di leucemiogenesi, il suo *triggering* dipende in larga misura anche da alterazioni del microambiente midollare. Quest'ultimo, interagendo con le cellule mutate, attiva una cascata di segnali extra ed intracellulari in grado di promuovere la sopravvivenza e la crescita delle LSC.

Recenti studi, infatti, hanno dimostrato che il completo silenziamento, in modelli murini, del gene del retinoblastoma (Rb) induce un'ematopoiesi extramidollare ed un disordine mieloproliferativo (Walkley et al., 2007). Al contrario, il trapianto in topi sani di cellule leucemiche inattivate per Rb non sviluppa la malattia. Conseguentemente questa osservazione indica che nei topi mutati il disordine mieloproliferativo è causato da un alterato rapporto tra progenitori ematopoietici e il microambiente midollare. Tali osservazioni sono state confermate anche nei topi mutati per il

recettore gamma dell'acido retinoico ($RAR\gamma^{-/-}$) la cui alterazione determina un'analogia malattia mieloproliferativa associata a carenza osteoblastica.

Anche l'inattivazione del gene PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) sia a livello delle cellule stromali che dei progenitori ematopoietici è responsabile di una sindrome mieloproliferativa che evolve in leucemia acuta (Yilmaz et al., 2006). Comunque, il trapianto in topi singenici di progenitori ematopoietici PTEN- non è di per sé un fattore scatenante la sindrome.

Rispetto alle HSC normali, le LSC presentano un'aumentata adesività allo stroma midollare mediata dall'interazione tra VLA-4 espresso dalle cellule leucemiche e la fibronectina prodotta dalle cellule dello stroma che facilita la permanenza delle LSC nella nicchia e la persistenza della malattia minima residua. Anche la proteina transmembrana altamente glicosilata CD44 svolge un ruolo fondamentale nell'ancoraggio delle LSC alle strutture stromali mediando le interazioni cellula-cellula e il legame alle componenti della matrice extracellulare midollare. Infatti, la somministrazione dell'anticorpo monoclonale anti-CD44 in topi NOD/SCID sottoposti a trapianto con cellule leucemiche umane, riduce la massa leucemica impedendo alle LSC di accasarsi nella nicchia.

Le LMA presentano, inoltre, alti livelli di CXCR4 significativamente correlati a prognosi non favorevole. In xenotrapianti in topi NOD/SCID è stato dimostrato che il CXCR4 è indispensabile per l'*homing* midollare delle LSC. Inoltre, evidenze sperimentali indicano che il ligando CXCL12 è responsabile della chemiotassi delle cellule leucemiche CXCR4 positive. Elevati livelli di espressione di CXCR4 sono osservabili nelle LMA che presentano il difetto di espressione molecolare "*Internal Tandem Duplication*" (ITD) a carico di Flt3 e ciò indica come tale citochina sia implicata nei fenomeni di *trafficking* ed *homing* delle LSC (Romboust et al., 2004). L'importanza dell'asse CXCL12/CXCR4 nell'accasamento delle cellule leucemiche è stata

recentemente sottolineata da Colmone et al. (2008). Cellule leucemiche trapiantate nel topo inizialmente migrano verso la nicchia vascolare CXCL12 positiva. Ad un mese dal trapianto, comunque, i livelli di CXCL12 nella nicchia decrescono e questa può essere colonizzata, a seguito di reinfusione di cellule staminali normali CD34⁺, mediante un meccanismo CXCL12 indipendente ma correlato ai livelli di *Stem Cell Factor* (SCF) secreto dai blasti leucemici. Ciò dimostra che la cellula leucemica può *by-passare* i normali meccanismi di *signaling* della nicchia ematopoietica fisiologicamente utilizzati dalle HSC per il proprio *homing*.

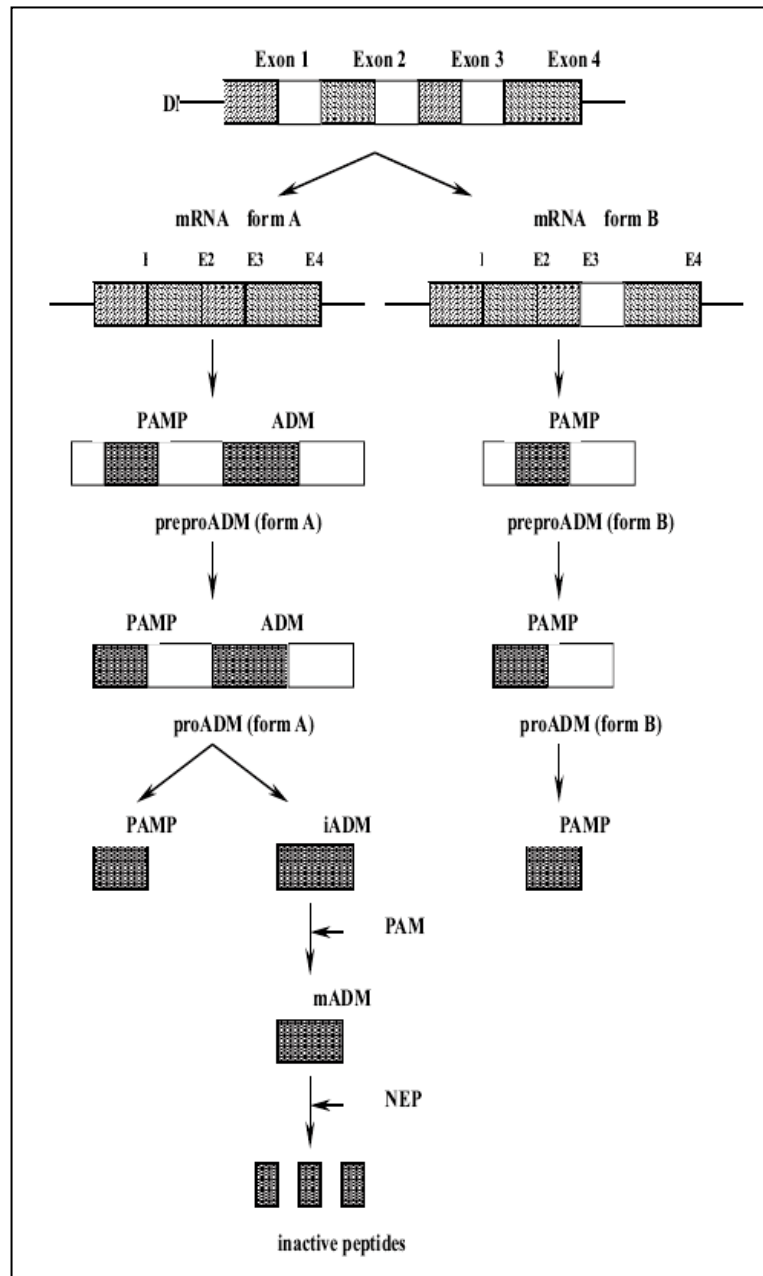
L'asservimento della nicchia al metabolismo della cellula leucemica è dimostrato anche dalla capacità delle LCS di proliferare in condizioni di ipossia. In queste condizioni i *cluster* neoplastici sviluppati producono elevati livelli del fattore trascrizionale 1 alfa (HIF-1 α), che a sua volta mediante *loop* paracrini incrementa l'espressione di CXCL12 sulla superficie delle cellule endoteliali e mediante induzione autocrina l'espressione CXCR4 nelle LMA. Con meccanismi analoghi HIF-1 α aumenta l'espressione di VEGF da parte delle LSC.

Pertanto, considerati globalmente, questi dati evidenziano come le integrine e in particolare l'asse CXCR4/CXCL12 potrebbero costituire un bersaglio per terapie antiblastiche innovative.

5. ADRENOMEDULLINA

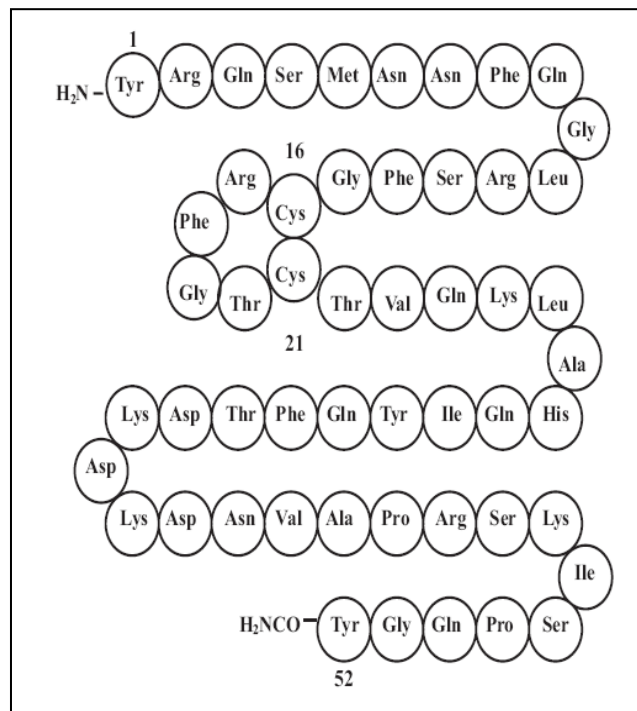
L'adrenomedullina (ADM) è un peptide noto soprattutto per le sue capacità ipotensive che funziona come un ormone circolante e come mediatore paracrino locale con diverse attività biologiche (Hinson et al., 2000). ADM è stata isolata per la prima volta dal feocromocitoma umano dal gruppo di Kitamura (Kitamura et al., 1993). In seguito, gli stessi Autori dimostrarono che ADM deriva dal taglio proteolitico di un pro-ormone, la preproadrenomedullina (ppADM), che all'estremità

amino-terminale presenta una sequenza di 20 residui aminoacidici, definita proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), in grado di esercitare un effetto ipotensivo transiente (Kitamura et al., 1994). Il gene umano per la ppADM è localizzato sul cromosoma 11 ed è costituito da quattro esoni e da tre introni (Ishimitsu et al., 1994) con TATA, CAAT e GC *boxes* all'estremità 5'. Inizialmente la ppADM è un pro-ormone lungo 185 aminoacidi, che successivamente viene ridotto a preadrenomedullina (pADM), lunga 164 aminoacidi, grazie a un taglio operato a livello del legame Thr-Ala . Il peptide PAMP si origina in seguito ad un ulteriore taglio a livello del legame Lys -Arg . Infine, nella pADM, vengono scissi i legami Lys -Arg e Arg -Arg per dare origine all'ADM, che nell'uomo è un peptide lungo 52 aminoacidi (Champion et al., 1999; Nussdorfer et al.,1997). L'amidazione enzimatica che porta alla formazione di ADM matura è mediata dall'enzima *Peptidylglycine α -Amidating Monooxygenase* (PAM) e viene coespresso con ADM in vari tessuti. I livelli di mRNA e l'attività dell'enzima PAM sono sovraregolati in alcuni tessuti anomali, compresi tumori, disfunzioni ormonali e agonisti adrenergici (Uzan et al., 2006).



Sintesi e metabolismo di ADM e PAMP (PAM-*peptidylglycine a-monooxygenase*, NEP- *neutral endopeptidase*).

ADM è un peptide contenente un anello di sei residui, formato da un ponte disolfuro tra i residui di cisterna nelle posizioni 16 e 21 e questo anello sembra essere essenziale per la sua attività biologica (Belloni et al., 2001). La parte C-terminale ha un residuo di tiroxina amidato (-CONH₂), struttura altrettanto fondamentale per la sua funzione.



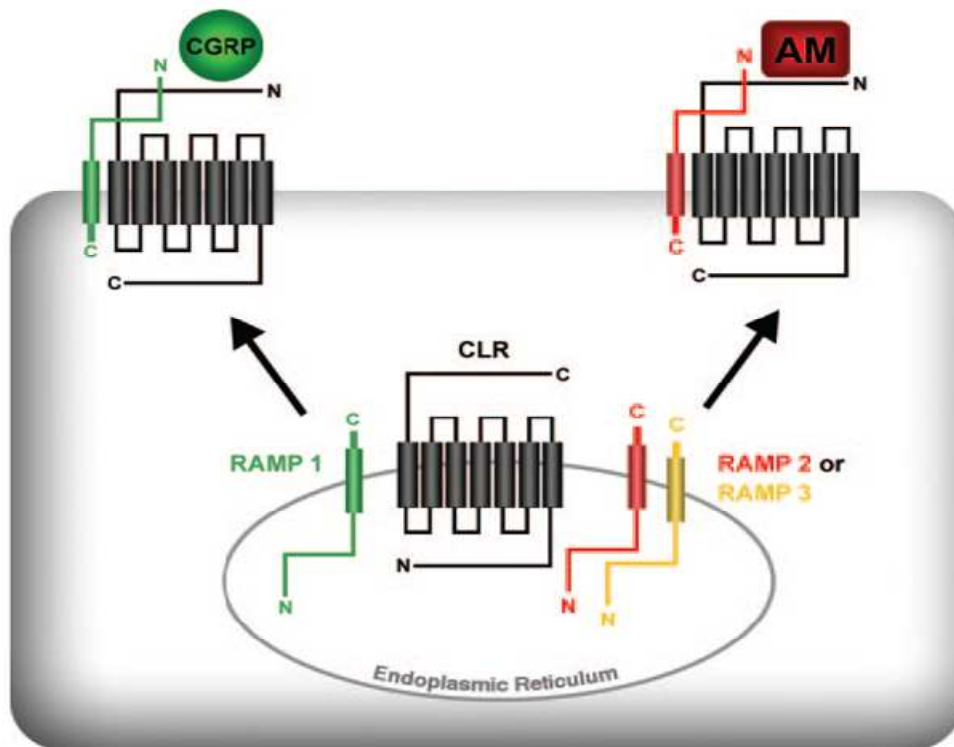
Struttura di ADM umana.

ADM appartiene ad una famiglia di peptidi che comprende la calcitonina (CT), i peptidi correlati al gene della calcitonina (calcitonin gene-related peptides, CGRP) e l'amilina (Muff et al., 2001). Inizialmente erano stati identificati due probabili recettori per ADM, il recettore L1 ad alta affinità e selettività per ADM (Kapas et al., 1995) e il chemokine-like receptor RDC1 a bassa affinità per ADM (Kapas et Clark, 1995).

Molte evidenze indicano che ADM agisce attraverso un recettore derivato dalla combinazione di due proteine, CRLR (calcitonin-receptor-like receptor) e RAMP (receptor-activity-modifying protein). La famiglia di proteine RAMP comprende tre membri che possono cambiare la specificità del recettore: RAMP1 genera con CRLR recettori per i CGRP (calcitonin gene-related peptide), mentre RAMP2 e RAMP3 generano recettori per ADM (McLatchie et al., 1998; Foord et Marshall, 1999; Chakravarty et al., 2000). La sequenza C terminale e la struttura dell'anello servono entrambe per il legame e

l'attivazione del recettore. Perciò, ADM₍₂₂₋₅₂₎ che manca della sequenza N terminale e della struttura dell'anello agisce come un antagonista selettivo di ADM (Belloni et al., 1998).

Come raffigurato in Figura 16, McLatchie e collaboratori, dimostrarono che l'associazione tra RAMP1 e CLR dà origine ad un recettore il quale lega preferibilmente CGRP, mentre l'associazione tra RAMP2 o RAMP3 con CRLR favorisce il legame con ADM. Così l'espressione spaziale e temporale delle proteine RAMP determina come una cellula o un tessuto saranno in grado di percepire e rispondere ad uno stimolo extracellulare di ADM o di CGRP. Considerato questo nuovo sistema recettoriale del segnale di GPCR, non sorprende che compagnie farmaceutiche e laboratori di ricerca stiano studiando le proprietà biochimiche e farmacologiche recettoriali di RAMP nella speranza di sfruttare questi ultimi come potenziali bersagli farmacologici per il trattamento di malattie umane correlate ad ADM e CGRP fisiologici.



Sistema recettoriale di RAMP per ADM e GPCR. RAMP conferisce specificità recettoriale attraverso la formazione di un eterodimero con CLR nel reticolo endoplasmatico, seguito dalla localizzazione sulla membrana plasmatica. L'associazione di CLR con RAMP determina specificità di legame. In questo modo, l'eterodimero CLR/RAMP1 (in verde) lega preferibilmente CGRP, mentre l'associazione di CLR con RAMP2 (in rosso) o RAMP3 (in giallo), lega principalmente ADM.

La biochimica e la farmacologia dei recettori RAMP è stata recentemente rivisitata in modo estensivo da Hay e colleghi (2006). Sebbene le tre proteine RAMP siano variabili come omologia di sequenza (30%) e distribuzione tissutale condividono una similitudine per massa molecolare (160 amminoacidi) e strutturale la quale consiste in un lungo ammino-terminale extracellulare, un dominio singolo transmembrana e un corto carbossi-terminale citoplasmatico. I RAMP hanno un distribuzione tissutale più ampia rispetto ad ADM e CLR, questo probabilmente è dettato dall'interazione degli stessi con un'altra classe II di GPCR come calcitonina, peptide intestinale vasoattivo/adenilato ciclasi pituitaria attivante il peptide 1, glucagone,

recettori PTH 1 e 2 e una classe III di GPCR chiamate recettore sensibile al calcio.

Analisi tessuto-specifiche di trascrittomi di uomo e topo rivelano che RAMP2 è tra i primi 10 modelli di espressione genica correlata con quella di CLR, suggerendo che la maggior parte dei CLR sono complessati con RAMP2 per formare un recettore funzionale di ADM. Anche se i profili di espressione genica temporale e spaziale dei RAMP possono essere uno strumento utile per la previsione di potenziali interazioni recettoriali e di funzioni fisiologiche, sono inoltre necessari dati farmacologici per confermare l'identità e la funzione di un presupposto interattivo tra recettore e/o peptide.

Ad oggi, sono stati effettuati più studi farmacologici su RAMP, attraverso la coltura di cellule eterologhe, che si basano su sistemi che utilizzano CLR come GPCR di interesse. Il dominio transmembrana dei RAMP, la regione più altamente conservata tra le specie, è necessario per la formazione di un eterodimero stabile con CLR all'interno del reticolo endoplasmatico e del Golgi. Il complesso rimane stabile attraverso la localizzazione sulla membrana plasmatica, l'attacco al ligando, l'attivazione del recettore, l'internalizzazione e il degrado o il riciclaggio del recettore. L'uso di proteine chimeriche RAMP1/2 ha dimostrato che la lunghezza extracellulare della coda N'-terminale conferisce uno specifico dominio *ligand-binding* con l'insolitamente esteso N'-terminale di CLR. Date le ridotte dimensioni dei RAMP è possibile che questi domini diversi non agiscano autonomamente ma interagiscano insieme per mediare sia l'interazione col recettore che l'affinità di legame col ligando (Gibbons et al., 2007).

Oltre i feocromocitomi e la midollare della ghiandola surrenale, anche il sistema cardiovascolare, i reni, i polmoni, la milza, l'apparato digestivo, l'utero, l'ovaia, la prostata, la tiroide, l'ipofisi e il cervello producono ADM. L'espressione più alta sembra avvenire nelle cellule cromaffini della midollare della ghiandola adrenale, nell'endotelio e

nelle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC, vascular smooth muscle cells) (Samson, 1999; Hinson et al., 2000).

ADM e PAMP circolano entrambi in quantità misurabili nel sangue dei mammiferi e le loro concentrazioni basali sono dell'ordine delle pM. Nell'uomo, i livelli ematici di ADM variano tra $2 \times 10^{-12} \text{M}$ e $4 \times 10^{-12} \text{M}$. Tale concentrazione nel plasma può incrementare in seguito a numerose patologie, quali l'insufficienza cardiaca, l'infarto del miocardio, lo *shock* settico (Nussdorfer, 2001) e disordini endocrini e renali (Hinson et al., 2000). Tuttavia, anche in condizioni patologiche, la concentrazione plasmatica dei peptidi derivati da pADM non supera mai 10^{-11}M , perciò essa rimane ben sotto la soglia per la maggior parte delle loro azioni biologiche fino ad ora note (circa da 10^{-10}M a 10^{-7}M) (Nussdorfer et al., 1997; Samson, 1999; Hinson et al., 2000). Il gene di pADM e i siti di legame per i peptidi derivati da pADM sono espressi in tutti i tessuti dove essi esercitano i loro effetti modulatori ed è stato calcolato che le loro concentrazioni locali possono raggiungere facilmente 10^{-7}M e 10^{-8}M (Nussdorfer et al., 1997). Per questo motivo, è comunemente accettato che i peptidi derivati da pADM agiscano come fattori locali autocrini o paracrini entro i tessuti e gli organi dove essi sono sintetizzati. L'emivita di ADM nel plasma è di 22 minuti e viene degradata inizialmente da metalloproteasi per generare ADM₂₋₅₂, ₂₇₋₅₂ e ₂₈₋₅₂ (Lewis et al., 1997).

Le azioni biologiche principali di ADM riguardano i vasi sanguigni e l'omeostasi. ADM evoca una ipotensione dovuta alla diminuzione della resistenza vascolare. Il rilassamento vascolare è attribuito all'attivazione di recettori accoppiati a proteine G, il cui meccanismo di segnale coinvolge la stimolazione della cascata adenilato ciclasi (AC)/protein-chinasi A (PKA).

Il segnale del recettore di ADM può anche coinvolgere l'attivazione della via fosfolipasi C (PLC)/ PKC-dipendente e canali calcio voltaggio dipendenti, portando ad un aumento della concentrazione di Ca intracellulare. ADM può aumentare l'attività della NO-sintasi evocando

la vasodilatazione attraverso la via NO/cGMP. Questo avviene con un doppio meccanismo: l'aumento della concentrazione del calcio intracellulare e l'attivazione delle NOS associate a proteine G (Samson,1999; Hinson et al., 2000; Jougasaki et Burnett, 2000). Altri effetti periferici di ADM comprendono l'inibizione del rilascio di ACTH, la diminuzione del rilascio di arginina-vasopressina evocato dall' iperosmolalità, la modulazione della funzione utero-placentare-fetale che potrebbe essere associata all'azione sul tono vascolare, la depressione dell'attività contrattile dell'utero, la regolazione della secrezione di insulina, la modulazione della funzione tubulare del rene, la stimolazione del rilascio di renina, la depressione della secrezione e della mobilità gastrica, l'inibizione della broncocostrizione indotta da istamina e acetilcolina e l'attività antimicrobica (Samson, 1999; Hinson et al., 2000; Nussdorfer, 2001).

Si sono accumulate evidenze che i peptidi derivati da pADM giochino ruoli importanti nella regolazione della proliferazione cellulare, della differenziazione e dell'apoptosi, attraverso la modulazione delle cascate delle proteine chinasi attivate dai mitogeni, MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Belloni et al., 2001). Sembra ben dimostrato che ADM favorisce il rimodellamento del sistema cardiovascolare, inibisce la crescita delle cellule mesangiali del glomerulo, aumenta la crescita della corticale della ghiandola adrenale, stimola la proliferazione delle cellule epiteliali e dei fibroblasti e agisce come promotore della crescita in parecchi tessuti neoplastici e linee cellulari. Inoltre si suppone che ADM e PAMP giochino entrambe ruoli regolatori durante l'embriogenesi. E' stato scoperto, infatti, che l'espressione del gene pADM raggiunge il massimo durante le fasi cruciali della crescita e differenziazione degli organi. ADM è coinvolta nei complessi meccanismi regolatori dello sviluppo dei mammiferi. Durante l'embriogenesi dei roditori, ADM è espressa all'inizio nel cuore e successivamente nei tessuti vascolari,

neurali e in quelli che formano lo scheletro, come anche nei principali organi embrionali interni (Belloni et al., 2001) .

E' stato dimostrato che ADM gioca un ruolo critico nella divisione delle cellule tumorali e nella riduzione della morte cellulare programmata. E' stato documentato anche che una varietà di tumori neuronali ed epiteliali produce quantità abbondanti di ADM. Inoltre, ADM e parecchi dei suoi recettori sono *up*-regolati durante l'ipossia. Studi sperimentali dimostrano che una sovraespressione di ADM porta ad un aumento della grandezza del tumore (Zudaire et al., 2003).

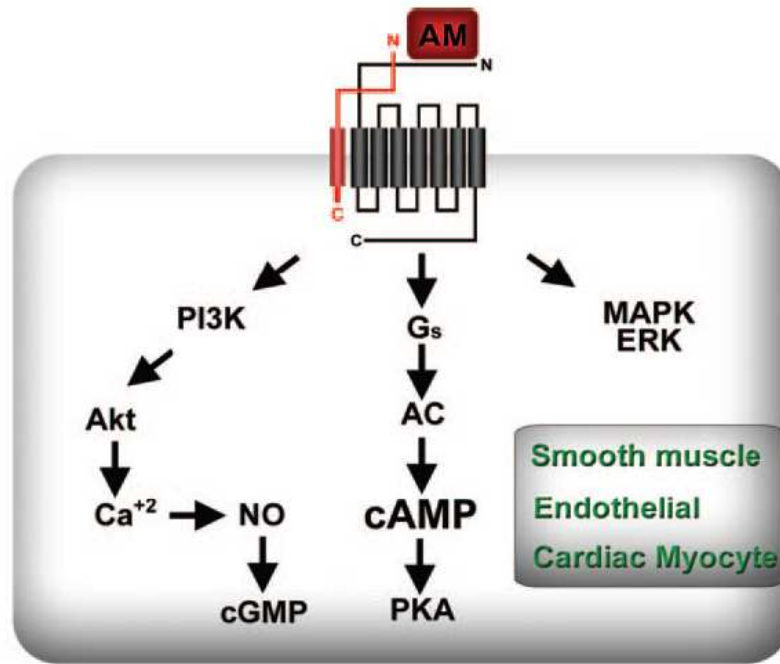
Cellule di Ishikawa (cellule di tumore dell'endometrio) trattate con ADM o transfettate e sovraesprimenti ADM mostrano un aumento nella resistenza all'apoptosi indotta dall'ipossia. Poiché queste cellule esprimono il recettore per ADM CRLR-RAMP2, la produzione e la secrezione di ADM possono stabilire un meccanismo autocrino/paracrino (Oehler et al., 2001). Withers e collaboratori hanno dimostrato che, in cellule Swiss 3T3, l'ADM stimola la proliferazione cellulare e questo effetto è incrementato dall'aggiunta di insulina. Questi effetti si attuano attraverso il legame dell'ADM a recettori specifici presenti sulle cellule Swiss 3T3, che porta ad un rapido aumento dei livelli di cAMP intracellulari, ma non a un aumento della concentrazione di calcio intracellulare, né all'attivazione della protein chinasi C o alla fosforilazione di substrati tirosinici intracellulari (Withers et al., 1996).

Tuttavia Chini e collaboratori hanno osservato che *in vitro* l'ADM inibisce la proliferazione cellulare delle cellule mesangiali attraverso un aumento dei livelli di cAMP intracellulari e l'attivazione della protein chinasi A. Inoltre, si nota una minor attivazione della cascata MAPK attivata da PDGF (Platelet Derived Growth Factor, fattore di crescita derivante dalle piastrine) (Chini et al., 1995). Ricerche ulteriori sono richieste per stabilire in quali circostanze ADM è un fattore mitogeno o antimitogeno. Kato e collaboratori (1997) e Sata e collaboratori (2000) isolarono cellule endoteliali (EC) da arterie di

ratto e dalla vena ombelicale umana. Attraverso indagini di tipo morfologico e biochimico, dimostrarono che l'aggiunta di ADM ai terreni di coltura inibiva l'apoptosi dovuta a deprivazione del siero, senza tuttavia indurre la proliferazione cellulare. Inoltre una sovraespressione di ADM è stata rilevata nei tumori al polmone (Ehlenz et al., 1997), nel tumore al tratto gastrointestinale (Ehlenz et al., 1997) e nell'adenoma ACTH-secernente (Murakami et al., 1998). Inoltre, è stato dimostrato che la secrezione di ADM dalle cellule endoteliali (EC) e dalle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) di ratto viene stimolata dall'aggiunta di IL-1, TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), LPS (lipopolisaccaridi) (Isumi et al., 1998; Sugo et al., 1995), Angiotensina II ed ET-1 (Chun et al., 2000; Sugo et al., 1995). L'effetto dello *shear* stress è controverso: sono stati descritti effetti inibitori (Shinoki et al., 1998) e stimolatori (Chun et al., 2000). Il gruppo di Hojo ha invece investigato l'espressione dell'ADM indotta dall'interazione tra cellule endoteliali umane della vena del cordone ombelicale (HUVEC) e cellule THP-1 (una linea monocitica umana). Questi ricercatori osservarono che la co-coltura di cellule THP-1 con HUVEC provocava in queste ultime, a 48 ore dalla semina, un aumento di 16 volte dell'espressione di ADM. Anche aggiungendo alle HUVEC frammenti di membrana delle cellule THP-1, si osservava un aumento dei livelli di ADM. In queste co-culture l'aggiunta di un anticorpo anti-IL-1 e del recettore per IL-1 portavano a una diminuzione dell'espressione di ADM (Hojo et al., 2001).

Cell type	
Cardiovascular system	
Vascular endothelial cells	Rat, pig, cow, human
Vascular smooth muscle	Rat, cow
Atrial and ventricular myocardium	Dog
Umbilical vein endothelial cells	Human
Cardiomyocytes	Rat, neonatal
Endocrine cells	
Zona glomerulosa	Rat
Cultured adrenocortical cells	Human
Adrenal cell line SW13	Human
Chromaffin cells	Rat
	Human
Pheochromocytoma	Human
Posterior pituitary	Rat
Central nervous system	
Paraventricular nucleus	Human
	Rat
Supraoptic nucleus	Human
	Rat
Infundibular nucleus	Human
Astrocytes	Rat
Glioblastoma cell line T98G and A172	Human
Blood cells	
Macrophage	Mouse
	Human
Cell line RAW264-7	Mouse
Cell lines THP-1 and HL60	}
Granulocytes	
Lymphocytes	
Monocytes	
Kidney	
Mesangial cells	Human
	Rat
	Rat
Glomerular epithelial cells	Human
	Mouse
	Rat
	Dog
Distal tubules	Dog
Collecting duct	Dog
	Rat
Renal tubular cell lines MDCK	Dog
LLCPK1	Porcine
MDBK	Bovine
Respiratory tract	
Bronchial epithelium	Fetal human
	Mouse
Columnar epithelium	}
Parasympathetic neurons	
Chondrocytes	
Alveolar macrophages	
Smooth muscle cells	Human
Reproductive system	
Granulosa cell	Rat
Placental trophoblasts	Human
Endometrial epithelium	Human
	Mouse
Endometrial macrophages	Human
Mammary ductal cells	Mouse
Prostatic epithelial cells	Rat
Skin	
Dermal epithelium	}
Keratinocytes	
Hair follicles	
Skin cell lines: CRL 7922	}
CRL 7729	
CRL 7585	
CRL 7687	
Gastrointestinal tract	
Epithelial cells	Mouse
Colorectal carcinoma cell line DLD-1	Human
Enterochromaffin cells	Rat
Pancreas	Rat
Gastric mucosa	Rat
Fibroblasts	
Rat-2	Rat
Swiss 3T3 cells	Mouse
Hs68	Human
NHLF	Human

Tipi di cellule che esprimono il gene adrenomedullina o sintetizzano adrenomedullina immunoreattiva (Hinson et al., 2000).



Risposte multiple di secondi messaggeri di ADM mediano una moltitudine di funzioni biologiche. I meccanismi funzionali di segnalazione cellulare di ADM sono stati per lo più studiati in cellule del sistema cardiovascolare, tra cui cellule muscolari lisce vascolari, cellule endoteliali e dei miociti cardiaci. Questi effetti combinati portano a numerosi esiti fisiologici che sono interconnessi all'interno dell'intero animale. AC: adenilato ciclastasi, PI3K: fosfatidilinositolo 3-chinasi, PKA: proteina chinasi A.

SCOPO DELLA TESI

Dalla revisione della Letteratura Scientifica riportata nell'introduzione emerge ampiamente il ruolo svolto dall'Adrenomedullina nella progressione neoplastica dei tumori solidi. Il suo coinvolgimento nelle patologie oncoematologiche, ed in particolare nella leucemia promielocitica acuta (APL), rimane ancora completamente inesplorato.

In base a tali considerazioni, queste ricerche si propongono di indagare gli effetti esercitati dal sistema adrenomedullinico sulla crescita e sulla differenziazione di cellule HL60, verificando la validità del suo *targeting* come possibile approccio terapeutico per APL.

Come modello sperimentale è stata utilizzata una linea stabilizzata di APL, HL60, che ha consentito di indagare i seguenti obiettivi specifici:

- 1) verifica della presenza del sistema adrenomedullinico e di *loop* autocrini mediante indagini di biologia molecolare, di proteomica e di citofluorimetria;
- 2) valutazione degli effetti indotti da ADM e Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ sulla proliferazione cellulare, mediante saggi di crescita dose- e tempo-risposta;
- 3) valutazione delle potenzialità differenziative dei peptidi (ADM e Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂) sull'immunofenotipo cellulare e sull'espressione di molecole regolatorie.

MATERIALI E METODI

1. COLTURE CELLULARI

E' stata utilizzata la linea cellulare umana HL-60, da leucemia promielocitica acuta, gentilmente fornita dal CRO di Aviano. Il ceppo CRO è strettamente siero-dipendente e viene coltivato in ISCOVE Medium (Safc Bioscences™) supplementato con il 20% Siero Fetale Bovino (FBS – Sigma Aldrich), penicillina (100 UI/ml), streptomina (100 µg/ml), fungizone (2.5 µg/ml) e kanamicina (100 µg/ml). Viene coltivato in sospensione, utilizzando densità di semina pari a 1×10^5 cellule/ml.

2. PEPTIDI

Adrenomedullina₅₂ e Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich.

Sono stati disciolti 0.1 mg di Adrenomedullina₅₂ (Sol. Madre $5 \times 10^{-7} \text{M}$) [MW=6028.80] in 33.174 ml di RPMI 1640 Dutch Modification, sterilizzati su filtri Millipore da 0.22 µm e suddivisi in aliquote da 500 µl per vial. Per ottenere una concentrazione finale pari a $5 \times 10^{-8} \text{M}$, sono stati utilizzati 100 µl di soluzione madre per ogni ml di terreno.

Sono stati disciolti 50 µg di ADM Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ (Sol. Madre 5×10^{-6}) [MW=3576.00] in 2.7964 ml di RPMI 1640 Dutch Modification, sterilizzati su filtri Millipore da 0.22 µm e suddivisi in aliquote da 300 µl per vial. Per ottenere una concentrazione finale pari a $5 \times 10^{-7} \text{M}$, sono stati utilizzati 100 µl di soluzione madre per ogni ml di terreno.

H-Thr-Val-Gln-Lys-Leu-Ala-His-Gln-
Ile-Try-Gln-Phe-Thr-Asp-Lys-Asp-
Lys-Asp-Asn-Val-Ala-Pro-Arg-Ser-
Lys-Ile-Ser-Pro-Gln-Gly-Tyr-NH₂

Figura 1. Sequenza amminoacidica di Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂

3. SAGGI DI CRESCITA

Per valutare l'effetto diretto di Adrenomedullina sulla linea cellulare, sono state condotte 4 prove seminando 5×10^5 cellule/ml in fiasche da 25 cm² in presenza/assenza di ADM alla concentrazione finale di 5×10^{-8} M (D1), 2.5×10^{-8} M (D2), 1.25×10^{-8} M (D3) e 0.625×10^{-8} M (D4). Per ogni esperimento è stato allestito un controllo (C) seminando le sole cellule nel terreno di crescita. Le colture sono state incubate per 24 e 72 h a 37°C, in presenza del 95% di umidità e 5% di CO₂. Al termine degli *end point*, le cellule sono state recuperate per centrifugazione a 1200 rpm per 5 min a 4°C. I pellet sono stati risospesi in 1ml di Iscove Medium e sottoposti a conta cellulare mediante Nexcelom Bioscience - Auto T4 Cellometer.

Per valutare l'effetto dell'inibitore sulla linea cellulare HL60 sono stati effettuati test colturali a breve termine, in terreno liquido, in piastre Beal da 24 pozzetti, trattando le cellule con ADM alla concentrazione inducente il massimo effetto proliferogeno (5×10^{-8} M), con l'inibitore (5×10^{-7} M), oppure con entrambi alle concentrazioni sopra riportate. In parallelo, colture non trattate sono state utilizzate come controllo. Dopo 24 e 72 h a 37°C, in presenza del 95% di umidità e 5% di CO₂ le cellule sono state raccolte, lavate in PBS1x, contate al Nexcelom Bioscience - Auto T4 Cellometer.

I risultati, media di 5 esperimenti, sono stati espressi come numero di cellule \pm deviazione standard. L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con il t test di Student.

4. CARATTERIZZAZIONE GENICA DEL SISTEMA ADRENOMEDULLINICO MEDIANTE RT-PCR: REAZIONE DI RETROTRASCRIZIONE E POLIMERIZZAZIONE A CATENA

4.1. Estrazione di mRNA

L'estrazione di mRNA ha previsto l'utilizzo del Trizol® Reagent (Sigma Aldrich), una soluzione monobasica di fenolo e guanidina isotiocianato. A differenti intervalli di tempo (24, 72 ore e 7 giorni), i controlli e le colture cellulari trattate con ADM (5×10^{-8} M) e Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ (5×10^{-7} M) sono stati raccolti, risciacquati in PBS e poi centrifugati a 1500 g per 5 min. Dopo eliminazione del surnatante, i campioni sono stati incubati in 1 ml di Trizol® Reagent per 5 min, a temperatura ambiente (TA). In seguito all'aggiunta di una soluzione di cloroformio (0.2 ml) (Sigma-Aldrich), i campioni sono stati agitati manualmente per 15 sec ed incubati per 3 min a TA. Dopo centrifugazione a 12000 g per 15 min a 4°C, la fase superiore acquosa è stata prelevata e trasferita in un tubo da 1.5 ml. Successivamente, è stata eseguita la precipitazione dell'acido nucleico RNA mediante l'aggiunta di 0.5 ml di soluzione di isopropanolo (Fluka) ed incubazione per 10 min a TA. I campioni sono stati poi centrifugati a 12000 g per 10 min a 4°C e i pellet sono stati lavati in 1 ml di soluzione di etanolo al 75% e poi centrifugati a 7500 g per 5 min a 4°C. Dopo rimozione del surnatante ed evaporazione delle tracce di etanolo, i campioni di RNA sono stati risospesi nella soluzione acquosa DEPC (dietilpirocarbonato) (Invitrogen), contenente l'inibitore delle RNase cellulari. I campioni sono stati trasferiti in tubi da 0.2 ml RNase-free e conservati a - 80°C.

4.2. Quantificazione spettrofotometrica di RNA

La quantificazione degli RNA estratti ha previsto l'impiego dello spettrofotometro NANODROP 2000 (Thermo Scientific). Utilizzando 1 µl di ciascun campione, è stata determinata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm. In parallelo, l'identificazione dell'assorbanza a 280 e a 230 nm, corrispondenti rispettivamente alla lunghezza d'onda di assorbimento di proteine e carboidrati, ha consentito di valutare la purezza degli RNA. Per lo studio di espressione genica, sono stati impiegati solo i campioni per i quali il rapporto 260/280 è risultato nel *range* 1,8-2,0.

4.3. Trattamento di RNA con RQ1 RNase-Free DNase

RQ1 (RNA Qualified) *Rnase-Free Dnase* (Promega) è una Dnasi tipo I (endonucleasi) in grado di degradare le doppie e le singole eliche di DNA producendo nucleotidi 3'-OH. Per questo tipo di trattamento è stata preparata una miscela contenente 1 µl di RNA (1 µg/µl), 1 µl di RQ1 *Rnase-Free Dnase* 10X *Reaction Buffer*, 1 µl (1 u/µg di RNA) di RQ1 *Rnase-Free Dnase* e 7 µl di acqua DEPC. Dopo incubazione a 37°C per 30 min, alla miscela è stato aggiunto 1 µl di RQ1 *Dnase stop solution*. Il trattamento è stato completato con un'incubazione a 65°C per 10 min.

4.4. Reazione di retrotrascrizione

I campioni di RNA sono stati retrotrascritti mediante allestimento di una reazione che ha previsto l'utilizzo di 1 µg di RNA, 1 µl di Oligo(dT)₂₃ Primers Anchored (Sigma-Aldrich) e 1 µl di dNTP (Sigma-Aldrich). Dopo incubazione a 70°C per 10 min e passaggio in ghiaccio, sono stati aggiunti 2 µl di Buffer M-MLV (Sigma-Aldrich), 1 µl di trascrittasi inversa del virus Moloney della leucemia murina (M-MLV) (Sigma-Aldrich), 0.5 µl di inibitore di RNase (Sigma-Aldrich) e 3.5 µl di acqua DEPC (Sigma-Aldrich), per un volume finale di

reazione di 20 µl. La soluzione è stata incubata per 10 min a TA, riscaldata per 50 min a 37°C e poi incubata per 10 min a 94°C.

4.5. PCR: reazione a catena della polimerasi

Un'aliquota di cDNA (3 µl) è stata amplificata mediante reazione PCR utilizzando 25 µl di mix dell'enzima Taq polimerasi contenente la miscela di dNTP (Sigma-Aldrich) e 1 µl di ciascuno dei primer, *forward* e *reverse*, sintetizzati dalla ditta Invitrogen e specifici per le sequenze di interesse. Sono stati aggiunti 21 µl di acqua sterile per raggiungere un volume finale di 50 µl. Le coppie di primer utilizzate per lo studio di espressione genica del sistema recettoriale di ADM sono indicate in Tabella I. In parallelo, è stata valutata l'espressione del gene *housekeeping* GAPDH (Gliceraldeide3 Fosfato Deidrogenasi).

Marcatore	Sigla	Sequenza (5'-3')	Sequenza di riferimento	di Lunghezza (pb)
Adrenomedullina	ADM	F-TCGCGTCGGAGTTTCGAAAGAAGT R-AAGTTGTTTCATGCTCTGGCGGTAG	NM_001124.1	228
Receptor-Activity-Modifying Protein 1	RAMP1	F-ATCACCTCTTCATGACCACTGCCT R-AAGAACCTGTCCACCTCTGCATTG	NM_005855.2	222
Receptor-Activity-Modifying Protein 2	RAMP2	F-TTATAGCACCTGCGAGATTGCCT R-GCCTCACTGTCTTTACTCCTCCAT	NM_005854.2	242
Calcitonin-receptor like receptor	CRLR	F-AACAACCAGGCCTTAGTAGCCACA R-GGTCGCCATGGAATCAGCACAAT	NM_005795.4	469
Gliceraldeide Fosfato deidrogenasi	3-GAPDH	F-AGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT R-ACAAAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	NM_002046.3	910

Tabella 1. Coppie di *primers* utilizzate nello studio di RT-PCR

La reazione è stata eseguita utilizzando il termociclatore PTC-100 (MJ Research Inc.) e le condizioni indicate in Tabella 2.

Fasi	Tempo	Temperatura
Denaturazione iniziale	5 min	94°C
Denaturazione/ciclo	1 min	94°C
Annealing/ciclo	1 min	51,5°C (GAPDH) 55,2°C (ADM) 50°C (RAMP1) 55,2°C (RAMP2) 53,4°C (CRLR)
Estensione	1 min	72°C
Numero di cicli: 40		
Estensione finale	10 min	72°C

Tabella 2: Fasi della reazione di RT-PCR allestita su cellule HL60 per lo studio di espressione di ADM, del sistema recettoriale adrenomedullinico e del gene *housekeeping* GAPDH

4.6. Elettroforesi su gel di agarosio

L'analisi elettroforetica dei prodotti di reazione PCR è stata eseguita su gel di agarosio (Sigma-Aldrich) preparato al 2 % in soluzione tampone TBE 1X (0.04 mM tris-Borato, 0.001 M EDTA, pH 8) (Sigma-Aldrich) e Gel Red (0.1 µl/ml) (Biotium).

Per ciascun campione, sono stati caricati su gel 8 µl di prodotto di amplificazione e 2 µl di soluzione colorante Gel Loading Buffer (Sigma-Aldrich). In parallelo, è stato caricato il PCR Marker (Sigma-Aldrich), un marcatore di riferimento di peso molecolare compreso tra 50 e 2000 pb. Le bande dei prodotti di amplificazione sono state visualizzate con lo strumento Gel Doc 2000 (BioRad).

5. CARATTERIZZAZIONE PROTEICA DEL SISTEMA ADRENOMEDULLINICO MEDIANTE WESTERN BLOTTING

5.1. Estrazione delle proteine

L'estrazione delle proteine è stata eseguita mediante trattamento con Trizol® Reagent secondo la procedura indicata nel paragrafo 4.1 ed aggiungendo alla fase fenolica di ciascun campione 0.5 ml di etanolo assoluto. Dopo agitazione manuale ed incubazione per 2 min a TA, i campioni sono stati centrifugati a 2000 g, per 5 min e a 4°C. Successivamente, il surnatante è stato prelevato ed incubato per 10 min, a TA con isopropanolo per la precipitazione delle proteine. Dopo una centrifugazione a 12000 g, per 10 min e a 4°C, il pellet è stato lavato per 2-3 volte con 1 ml di soluzione contenente Guanidina Idrocloride (Sigma Aldrich) (0,3 M) preparata in etanolo al 95%. Ad ogni lavaggio è seguita una centrifugazione a 7500 g, per 5 min e a 4°C. Terminati i lavaggi, il pellet è stato incubato per 20 min a TA in una soluzione di etanolo assoluto. Dopo centrifugazione a 7500 g, per 5 min e a 4°C, il surnatante è stato scartato ed il pellet è stato risospeso in 0.1 ml di una soluzione di SDS (Sodio Dodecil Solfato Sigma Aldrich) all'1% ed incubato a 50°C. Dopo una centrifugazione a 10000 g, per 10 min, a 4°C, il surnatante è stato prelevato e conservato a -20°C.

5.2. Quantificazione proteica

La quantificazione delle proteine estratte dai campioni di controllo e da colture trattate con ADM e Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ è stata eseguita utilizzando il *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific), che si basa sulla compatibilità dell'acido bicinconinico (BCA) per il rilevamento colorimetrico e la quantificazione delle proteine totali. La reazione prevede la riduzione di Cu^{2+} in Cu^{1+} da parte delle proteine, in un *medium* alcalino, combinata con l'elevata sensibilità e selettività

colorimetrica dei cationi rameici usando un unico reagente contenente acido bicinconinico. Lo sviluppo della tipica colorazione porpora è successivo alla chelazione di due molecole di BCA con uno ione rame. Questo complesso, solubile in acqua, assorbe a 562 nm, valore linearmente vicino alla concentrazione proteica nell'intervallo 20-2000 µg/ml.

Alla quantificazione è seguita la separazione su gel di *bis*-poliacrilammide (SDS-PAGE) e successivo Western Blotting, con anticorpi anti-ADM, -RAMP 1, -RAMP 2 e -CRLR.

5.3. Analisi mediante Sodio Dodecil Solfato Poliacrilammide Gel Elettroforesi (SDS-PAGE)

Dopo aggiunta di 25 µg di proteine totali di ciascun campione ad una soluzione contenente Tris HCl 50 mM (pH 6.8) (Sigma), SDS al 2% (Sigma), glicerolo al 10% (Sigma), β-mercaptoetanololo al 5% (Fluka), blu di bromofenolo allo 0.03% (Sigma) e successiva denaturazione a 95°C per 5 min, un volume totale di 50 µl di miscela è stato caricato su un gel di poliacrilammide discontinuo preparato in cella per elettroforesi VP-140 (Elettrofor). Il gel è costituito da 10 ml di *stacking* gel [soluzione di acrilammide /*bis*-acrilammide (37:1) al 4%, Tris HCl (125 mM, pH 6.8), SDS al 10%, 100 µl di ammonio persolfato (APS), 16 µl di TEMED (Sigma-Aldrich)] e 20 ml di *running* gel [soluzione di acrilammide/*bis*-acrilammide (37:1) al 18%, Tris HCl (375 mM, pH 8.8), SDS al 10%, 70 µl di APS, 15 µl di TEMED]. La corsa elettroforetica è stata eseguita a voltaggio costante (120 Volt), per 2 h in tampone preparato con Tris HCl (25 mM, pH 8.3), glicina (192 mM) (Sigma) e SDS allo 0.03 %. Dopo la separazione, le proteine sono state trasferite su una membrana di *Polyvinilidene fluoride* (PVDF) (Millipore) con porosità 0.45 µm, attivata in metanolo (Carlo Erba) per 15 sec, idratata in acqua MilliQ per 2 min ed equilibrata per 5 min in un tampone di trasferimento contenente Tris HCl (25 mM, pH 8.3), glicina (192 mM), SDS allo 0.03% e metanolo

al 20%. Successivamente, l'apparato di trasferimento è stato assemblato e sottoposto ad un voltaggio di 120 V per 1 h e 30 min, a 4°C.

5.4. Immunoblotting

Il blocco dei siti aspecifici è stato eseguito mediante l'incubazione della membrana per 1 h con una soluzione al 10% di latte scremato (Sigma) in TBS-T [Tris HCl (pH 7.6), NaCl allo 0.1%, Tween 20 allo 0.05%] a TA e in agitazione. Dopo due lavaggi rapidi in TBS-T, le membrane sono state incubate con una soluzione di anticorpo primario mouse anti-GAPDH (Millipore) (diluito 1:500), o goat anti-ADM (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (diluito 1:200), o rabbit anti-RAMP1/2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (diluiti 1:200) e goat anti-CRLR (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Tutti gli anticorpi sono stati preparati in una soluzione all'1% di latte scremato in TBS-T e l'incubazione è stata eseguita per una notte, in agitazione e a 4°C. Dopo aver eseguito diversi lavaggi in TBS-T, le membrane sono state incubate per 1 h a TA con l'anticorpo secondario anti-mouse, -goat e -rabbit HRP (GE Amersham), diluiti 1:3000 e successivamente lavate in TBS-T.

5.5. Rivelazione

La rivelazione è stata eseguita secondo il protocollo suggerito dalla ditta fornitrice del kit ECL (GE Amersham), che prevede l'incubazione per 1 min della membrana con 0.125 ml/cm² di soluzione di rivelazione, preparata con le soluzioni A e B, nel rapporto 1:1. Dopo eliminazione dell'eccesso di ECL, le membrane sono state poste nella cella di esposizione, al buio e a contatto con una lastra autoradiografica (GE Amersham), per un tempo variabile da 1 a 15 min. Successivamente, la lastra impressionata è stata sviluppata tramite incubazione nel liquido di sviluppo X-OMAT EX II e di fissaggio RP X-OMAT LO (Kodak).

6. CITOFUORIMETRIA

6.1. Studio dell'immunofenotipo

L'identificazione di specifici marcatori di membrana sulla linea cellulare HL60 Cro è stata eseguita mediante citometria a flusso (CFM) con citofluorimetro FACSCanto II della ditta Becton Dickinson (San Jose, California).

6.2. Basi teoriche della CFM

La nascita della citofluorimetria a flusso (CFM) avviene intorno agli anni '70, determinando un veloce ed intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche. Inizialmente era limitata alla misura di 1-2 parametri: uno per le misure fisiche e l'altro per la fluorescenza. La CFM portò grande impulso allo studio del sistema immunitario, grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con *isotiocianato di fluoresceina* (FITC). La grande complessità del sistema immunitario e la presenza di diverse subpopolazioni che reagivano con lo stesso anticorpo permisero di sviluppare a) anticorpi monoclonali sempre più specifici; b) la ricerca di nuovi coloranti fluorescenti da coniugare agli anticorpi; c) la creazione di citofluorimetri a flusso multiparametrici.

Inizialmente, i primi problemi che gli studiosi dovettero affrontare furono trovare coloranti che potessero essere coniugati agli anticorpi senza modificare la loro capacità di legame all'antigene, e selezionare fluorocromi con spettri distinti di emissione. Un punto di svolta nella CFM fu lo sviluppo di coloranti come le ficobiliproteine, fluorocromi naturali solubili in acqua, fluorescenti a pH neutro, facilmente coniugabili con anticorpi monoclonali, con elevate rese quantiche (Figura 2).

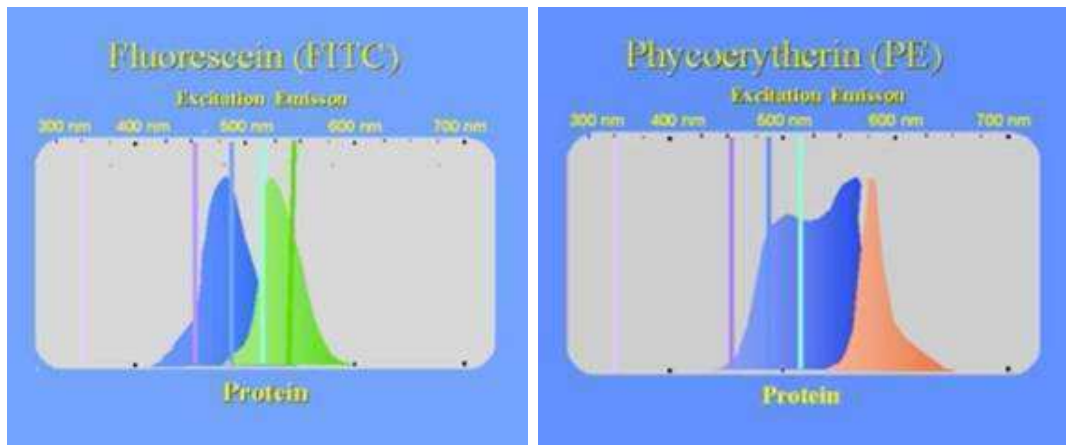


Figura 2. Spettro di eccitazione-emissione dei fluorocromi FITC e PE.

L'analisi citofluorimetrica permette di misurare caratteristiche chimiche e fisiche delle cellule o, per estensione, di altre particelle biologiche. Rende possibile la misurazione di proprietà multiple di singole cellule ad una velocità molto rapida, permettendo una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa di sospensioni cellulari monodisperse e si basa sulla misurazione, mediante l'utilizzo di anticorpi coniugati con fluorocromi, di alcune caratteristiche della cellula quali la dimensione, la granularità superficiale, il contenuto di DNA, di RNA, l'organizzazione del citoscheletro, il potenziale di membrana, i recettori di superficie ed intracellulari, le attività enzimatiche o la fosforilazione di proteine.

6.3. Principio di funzionamento della CFM

Il campione da analizzare, costituito da una sospensione cellulare, viene convogliato da un sistema fluidico di trasporto o sheath fluid, generalmente PBS o altro tampone, fino al punto in cui avviene la misurazione, cioè nella camera di flusso. Il diametro del flusso è determinato dal nozzle tip, un piccolo orifizio cilindro-conico in ceramica scelto in base alle dimensioni delle particelle da separare (70-100 μm di diametro). Nella camera di flusso il campione incontra un fascio di luce laser focalizzata di alcune decine di micron (Figura 3).

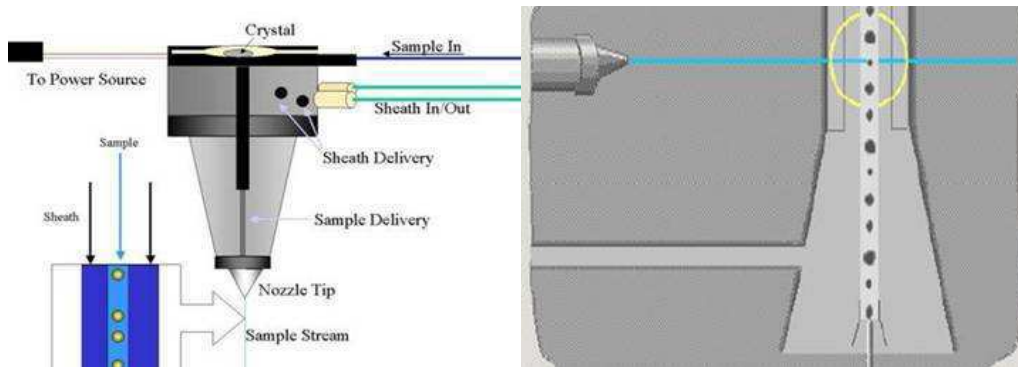


Figura 3. Camera di flusso e punto in cui il laser intercetta le cellule.

Quando il raggio di luce intercetta il flusso cellulare (*stream*), il suo incontro con ogni singola cellula genera dei segnali legati alle caratteristiche fisiche della particella (diametro, rapporto nucleo/citoplasma, granularità interna, rugosità di membrana), e alla presenza di molecole fluorescenti localizzate in diversi siti. Una volta emessi, i segnali vengono raccolti da un sistema di lenti, specchi dicroici e filtri ottici, ed inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. Questi segnali elettrici (analogici) provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati, digitalizzati e associati tra loro, sono inviati ad un computer che provvede alla presentazione dei medesimi e alla loro definizione statistica (Figura 4).

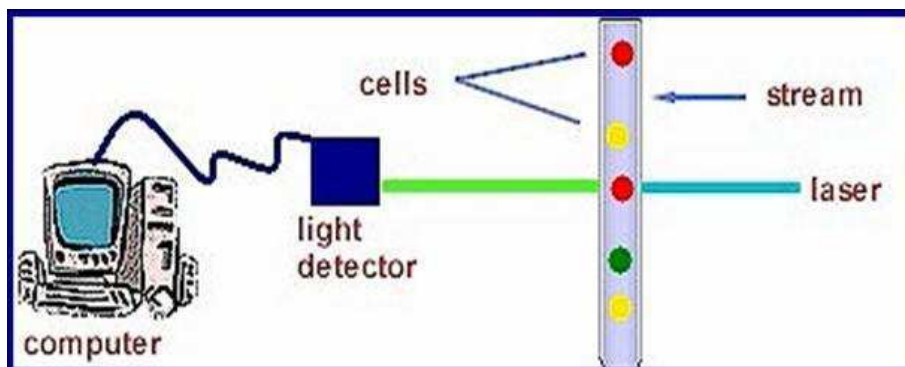


Figura 4. Schema del citofluorimetro.

6.4. Analisi di citofluorimetria

Tutti i campioni destinati all'analisi dell'immunofenotipo in condizioni di espansione basale o di trattamento con ADM e Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ sono stati raccolti, centrifugati e risospesi in una soluzione di PBS contenente albumina sierica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) allo 0.2% (PBS-BSA). In particolare, 2×10^5 cellule sono state risospese in 100 μ l di PBS-BSA ed incubate con 5 μ l di anticorpo primario (Tabella 3), per 15 minuti, a TA e al buio. Per gli anticorpi non coniugati a fluorocromo, la marcatura è stata eseguita in modo indiretto, facendo seguire all'incubazione con l'anticorpo primario la fase di trattamento con l'anticorpo secondario-coniugato a fluorocromo (Tabella 3). In parallelo, i controlli di marcatura sono stati allestiti trattando i campioni con il corrispondente anticorpo isotipico o anticorpo secondario. Al termine della marcatura, tutti i preparati sono stati risciacquati con PBS-BSA e poi centrifugati a 1200 g per 5 minuti. Dopo allontanamento del surnatante, i campioni sono stati risospesi in 200 μ l di tampone FACSFlow (Becton Dickinson-San Jose, California) e poi caricati su citofluorimetro a flusso FACSCanto II della ditta Becton Dickinson (San Jose, California). Mediante il programma FACS DIVA sono stati acquisiti i dati relativi a 1×10^4 cellule totali, nel range di lunghezza d'onda di 530 ± 40 (FITC) e 580 ± 30 nm (PE). I risultati, espressi come percentuale di cellule positive rispetto al controllo di marcatura oppure al controllo non trattato con ADM o Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂, sono stati ottenuti applicando la funzione statistica *Substraction* del programma di analisi Summit 4.3 (Beckman Coulter).

Marcatore	Anticorpo I	Ditta fornitrice	Anticorpo II	Ditta fornitrice
mouse anti-CD2	FITC	Becton Dickinson		
rat anti-CD11b	FITC	Becton Dickinson		
mouse anti-CD11c	FITC	Becton Dickinson		
mouse anti-CD13	FITC	Santa Cruz		
mouse anti-CD14	PE	Becton Dickinson		
mouse anti-CD24	FITC	Santa Cruz		
mouse anti-CD34	PE	Becton Dickinson		
mouse anti-CD33	FITC	Santa Cruz		
mouse anti-CD38	PE	Becton Dickinson		
mouse anti-CD45	PE	Becton Dickinson		
mouse anti-CD45RA	FITC	Becton Dickinson		
mouse anti-CD66	FITC	Becton Dickinson		
mouse anti-CD66b	FITC	Becton Dickinson		
mouse anti-CD127	FITC	Becton Dickinson		
mouse anti-CD235a	FITC	Becton Dickinson		
mouse anti-HLA-DR	PE	Santa Cruz	PE anti-goat	Santa Cruz
goat anti-ADM	non coniugato	Santa Cruz	Alexa 488 anti-rabbit	Invitrogen
rabbit anti-RAMP1	non coniugato	Santa Cruz	Alexa 488 anti-rabbit	Invitrogen
rabbit anti-RAMP2	non coniugato	Santa Cruz		

Tabella 3. Lista di anticorpi utilizzati per l'analisi citofluorimetrica su colture in espansione basale o trattate con ADM e Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂

7. REAL TIME PCR (qPCR)

Lo studio quantitativo di espressione genica è stato eseguito per meglio discriminare le variazioni indotte da ADM e Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ sui livelli di mRNA del gene Cul-5, il cui aumento è riconosciuto come significativo della rimozione del blocco differenziativo delle cellule leucemiche promielocitiche dopo trattamento con ATRA (Baxter et al., 2009).

La qPCR misura l'amplificazione in tempo reale della sequenza target durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione,

permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR semiquantitativa. La misura si basa sull'identificazione di una fluorescenza e sulla diretta proporzionalità alla quantità di prodotto di amplificazione; tale fluorescenza, durante ogni ciclo di amplificazione, può essere rilevata utilizzando dei marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione di PCR. In questo caso non viene eseguita la corsa su gel d'agarosio e l'analisi del prodotto di fluorescenza avviene tramite un software dedicato. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle molecole fluorescenti che si intercalano nel DNA a doppio filamento (per esempio *SYBR Green*) oppure oligonucleotidi fluorescenti, denominati sonde, che si ibridizzano con il DNA e comprendono ad esempio le sonde *TaqMan*. Il *SYBR Green* è una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA. All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, i primer e la molecola fluorescente. Dopo l'annealing dei primer, si legano poche molecole fluorescenti alla doppia elica e durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone, cioè dei prodotti della PCR. La molecola fluorescente, non essendo specifica, si lega in modo random a tutte le doppie eliche inclusi i dimeri di primer ed eventuali prodotti aspecifici. Tuttavia, considerato che il *SYBR Green* non emette fluorescenza in assenza di DNA a doppia elica, se dopo l'amplificazione i campioni vengono riscaldati e viene registrata la variazione della fluorescenza al variare della temperatura, si può generare una curva di dissociazione (detta *Curva di Melting*), caratteristica di ogni prodotto di amplificazione. Più precisamente viene definita la temperatura di melting (T_m) come la temperatura alla quale la metà del DNA si trova nello stato a doppia elica e la metà in quello denaturato. La T_m dipende sia dalla lunghezza totale della molecola di DNA sia dalla specifica sequenza dei nucleotidi; a ogni prodotto di PCR corrisponde

pertanto una T_m caratteristica.

I vantaggi della qPCR sono molteplici:

- la maggiore sensibilità (può testare con affidabilità fino a 0,5 picogrammi di DNA) e specificità (dovuta all'appaiamento specifico dei primer e della sonda all'interno dell'amplicone);
- la possibilità di monitorare la reazione di PCR durante il suo sviluppo e registrare l'emissione della fluorescenza durante la reazione;
- permette di acquisire un dato quantitativo con un ampio range (10^1 - 10^7 copie);
- riduzione dei tempi di analisi e dei rischi di contaminazione.

La reazione di qPCR è stata allestita utilizzando, per ciascun campione, 25 μ l di Platinum[®] SYBR Green qPCR SuperMix UDG, 1 μ l di *forward primer* (10 μ M), 1 μ l di *reverse primer* (10 μ M), 1 μ g/ μ l di cDNA e acqua distillata fino a volume finale di 50 μ l. I campioni sono stati, quindi, incubati a 50°C per 2 min per attivare l'enzima UDG e, successivamente a 95°C per 2 min. Sono stati eseguiti 50 cicli di amplificazione con lo step di denaturazione a 95°C per 30 sec, quello di annealing a 60°C per 30 sec ed infine quello di estensione a 72°C per 1 min. I campioni sono stati poi caricati sullo strumento DNA Engine Opticon Real Time Thermal cycler (BioRad). I dati relativi all'espressione del gene Cul-5 sono stati raccolti in termini di Ct (ciclo soglia) ed analizzati utilizzando il metodo del ΔCt (delta Ct) ovvero la quantificazione basata sul confronto del Ct del gene target con quello del gene *housekeeping* di riferimento (calibrator).

Il ΔCt ottenuto da due o più campioni relativi ad una condizione sperimentale può essere utilizzato per calcolare il $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct), un valore utile alla definizione dei rapporti relativi di espressione tra campioni appartenenti a differenti condizioni sperimentali.

L'analisi di espressione del gene Cul-5 è stata eseguita sui controlli e campioni di trattato con ADM e INH utilizzando i primer indicati in

Tabella 4. Il gene calibrator impiegato è stato il gene HPRT (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)

Marcatore	Sigla	Sequenza (5'-3')	Sequenza di riferimento	di Lunghezza (pb)
Cullin 5	Cul5	F- GAACCAAAGACCCAGAGAGAAA	NM_003478.3	81
		R- GTCCTCCTAAGTTCAGCATCAG		
<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>	HPRT	F- ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT	NM_000194.2	79
		R- TGAGCACACAGAGGGCTACAATG		

Tabella 4. Sequenza di primer utilizzati nell'analisi di espressione di Cul-5 mediante qPCR su cellule HL60 coltivate in presenza o meno di ADM e Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂

RISULTATI E DISCUSSIONE

Negli ultimi anni numerose evidenze sperimentali hanno indicato che ADM è un importante regolatore della carcinogenesi e della progressione di vari tipi di tumori solidi e hanno indicato il suo loop autocrino come un possibile bersaglio per lo sviluppo di nuove strategie anti-tumorali. Infatti, è sovraespressa nelle cellule tumorali, dove agisce come fattore mitogenico, anti-apoptotico e pro-angiogenico, inducendo in tal modo un fenotipo più aggressivo della forma tumorale, anche in virtù dell'effetto inibente esercitato sul sistema immunitario.

Sebbene sia noto che ADM viene espressa da tutte le cellule terminali, sia della filiera mieloide che linfoide (Hojo et al., 2001; Kubo et al., 1998; Nakayama et al., 1999) e da progenitori ematopoietici, il suo possibile coinvolgimento nella patogenesi di forme leucemiche rimane ancora da verificare. In particolare, nel 1998 Kubo e collaboratori hanno dimostrato che ADM viene secreta da granulociti, linfociti, monociti e macrofagi isolati da sangue periferico. Successivamente, Nakayama e collaboratori (1999) hanno evidenziato che i macrofagi derivanti da monociti esprimono livelli di mRNA per ADM cinque volte superiori rispetto ai monociti. In entrambi i tipi cellulari, l'espressione di ADM può essere incrementata esponendo per 24 ore queste cellule a lipopolisaccaride (LPS). Inoltre, è stato dimostrato che il peptide viene prodotto dalle cellule staminali ematopoietiche presenti nel sangue cordonale e ne stimola *in vitro* l'espansione e la crescita clonale (Del Pup et al, 2003; De Angeli et al, 2004).

Sulla base di tali presupposti, in questa tesi è stato valutato il ruolo svolto da ADM nel mantenimento del fenotipo leucemico e la possibilità di reversare il blocco maturativo, caratteristico dell'APL, tramite inibizione del sistema adrenomedullinico.

A tal fine, la sperimentazione è stata effettuata sulla linea cellulare promielocitica HL60, in quanto viene ampiamente usata come modello di differenziazione cellulare leucemica mieloide, e può essere indotta *in vitro* al differenziamento in senso granulocitario, monocitario o macrofagico in seguito a trattamento con vari tipi di fattori. Le cellule HL60 crescevano in sospensione, come cellule singole, e la maggior parte di esse presentava una morfologia promielocitica (Figura 5).

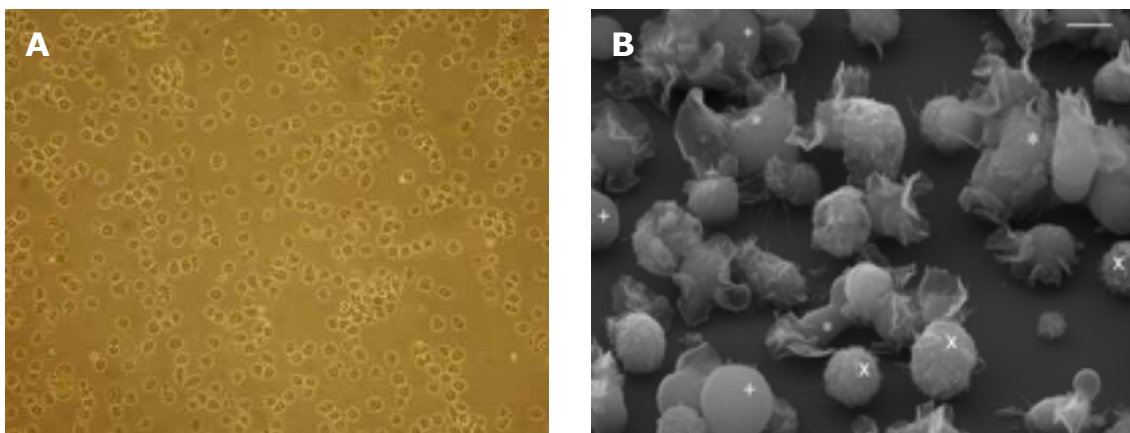


Figura 5. Microscopia ottica (A) ed elettronica a scansione (SEM: B) di colture di cellule HL60.

L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato che le cellule HL60 esprimevano alcuni marcatori compatibili con l'immunofenotipo delle forme di leucemia mieloide acuta (Tabella 5). I CD11b e CD11c sono componenti di molecole di adesione eterodimeriche. Il CD11b è espresso da granulociti, monociti/macrofagi, cellule natural killer e, in parte, dai linfociti. Il CD11c presenta alti livelli di espressione in monociti/macrofagi e cellule natural killer (Schymeinsky et al., 2007). Il CD33 è un recettore transmembrana espresso dalle cellule della linea mieloide e dai precursori dei monociti/granulociti (Hernández-Caselles et al., 2006). Il CD34, glicoproteina transmembrana, è un fattore di adesione che media l'attacco delle cellule staminali alla matrice extracellulare del midollo o direttamente alle cellule stromali. Viene espresso nei progenitori ematopoietici (Okuno et al., 2002). Il CD38 è una glicoproteina con funzioni enzimatiche localizzata sulla

superficie dei progenitori ematopoietici della linea eritroide, linfoide e mieloide durante i primi stadi di maturazione (Ferrero et al., 1997). Il CD45 è una protein tirosin fosfatasi di tipo recettoriale che è presente in varie isoforme su tutte le cellule ematopoietiche differenziate. E' coinvolta nella regolazione di numerosi processi cellulari, quali la crescita, la differenziazione e il ciclo mitotico. Tra le varie isoforme, il CD45RA è presente nei linfociti T naive (Huntington et al., 2005) e la sua presenza si associa a numerose forme di leucemia mieloide acuta con selettiva espressione da parte dei blasti delle forme più immature. Il CD66 (*carcinoembryonic antigen, CEA, Biliary glycoprotein I, BGP-1, BGP-1, CECAM*) appartiene alla superfamiglia di immunoglobuline di geni che codificano per proteine di adesione cellulare, che si esprimono a livelli più alti nei tessuti tumorali che nei tessuti normali. La famiglia del gene CD66 umano è un insieme eterogeneo di glicoproteine di lignaggio epiteliale ed ematopoietico che comprende 29 geni che mappano in posizione 19q13.1-q13.2. Il CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e e CD66f sono gli antigeni CD66 meglio caratterizzati e l'espressione delle isoforme CD66a-d aumenta sulla superficie di granulociti in fase di differenziamento (Skubitz et al., 1996). Il CD66b (CEACAM8, CGM6, NCA-95) è una glicoproteina a singola catena *GPI-anchored* ed è un membro della superfamiglia delle Immunoglobuline. E' espresso esclusivamente sui granulociti umani ed è riconosciuto come un "marker di attivazione" granulocitaria (Yoon et al., 2007). Il CD2 è una molecola di adesione cellulare presente sulla superficie delle cellule T e natural killer, a livello delle quali anche come molecola co-stimolatoria (Wilkins et al., 2003). Tale antigene è espresso in una percentuale variabile dal 3 al 16% dei casi di leucemia mieloide acuta, sottotipi M2 e M3. L'antigene CD235 è presente nelle isoforme A e B ed è caratteristico degli eritrociti maturi e dei precursori eritroidi (Van Beers et al., 2009). La sua espressione è stata osservata su cellule leucemiche della serie mieloide, determinando una forma caratteristica di

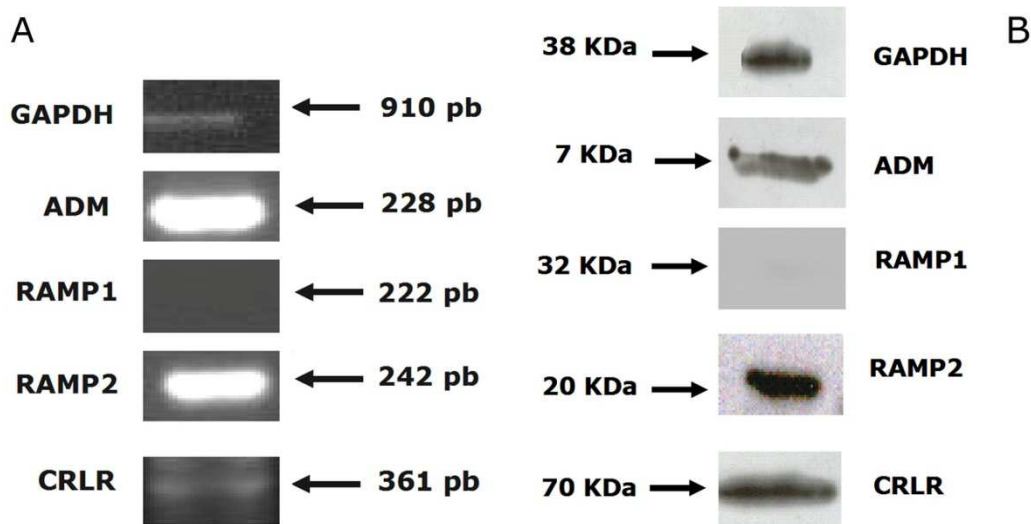
leucemia mieloide acuta, detta eritroblastica (sottotipo M6). HLA-DR è un eterodimero costituito da una catena alfa e una catena beta. E' costitutivamente presente su una moltitudine di tipi cellulari tra cui i linfociti B immaturi e maturi, ma anche monociti e macrofagi. L'antigene è costitutivamente espresso sui precursori della serie mieloide ed eritroide ma non sulle cellule più mature (Klitz et al., 2003).

Marcatore	Espressione (%)±DS
CD2	0
CD11b	89.3±2.15
CD11c	16.9±1.51
CD33	99.8±2.53
CD34	22.2±2
CD38	49.2±2.1
CD45	91.2±3.2
CD45RA	4.2±0.9
CD66B	0
CD235a	4.5±0.8
HLA-DR	0

Tabella 5. Caratterizzazione immunofenotipica della linea promielocitica HL60. I risultati, media di 3 esperimenti, sono espressi come percentuale di cellule positive rispetto al controllo isotipico ± deviazione standard (DS).

Nel presente studio, l'analisi di citofluorimetria rilevava un'elevata espressione dei marcatori quali il CD33, mentre risultava nulla o a livelli molto bassi la presenza di antigeni quali HLA DR e CD45RA. La dimostrata presenza dei marcatori CD34, CD38, CD2 e CD11b conferma l'appartenenza della popolazione HL60 alla serie mieloide ed

è in linea con quanto riportato in letteratura su alcune forme di leucemia mieloide acuta. Non espressi o identificabili a livelli non significativi i marcatori di differenziamento granulocitario, come il CD66b e il CD11c, e della linea eritroide, quale il CD235a. Inoltre, le cellule HL60 possedevano il sistema adrenomedullinico, come dimostrato dalla presenza negli estratti cellulari di ADM e del suo sistema recettoriale, costituito da RAMP2 e CRLR, sia come mRNA (Figura 6A) che come proteina (Figura 6B). Al contrario, non veniva rilevata la presenza di RAMP1. L'analisi citofluorimetrica ha confermato i risultati ottenuti tramite Western Blot (Figura 6C).



C

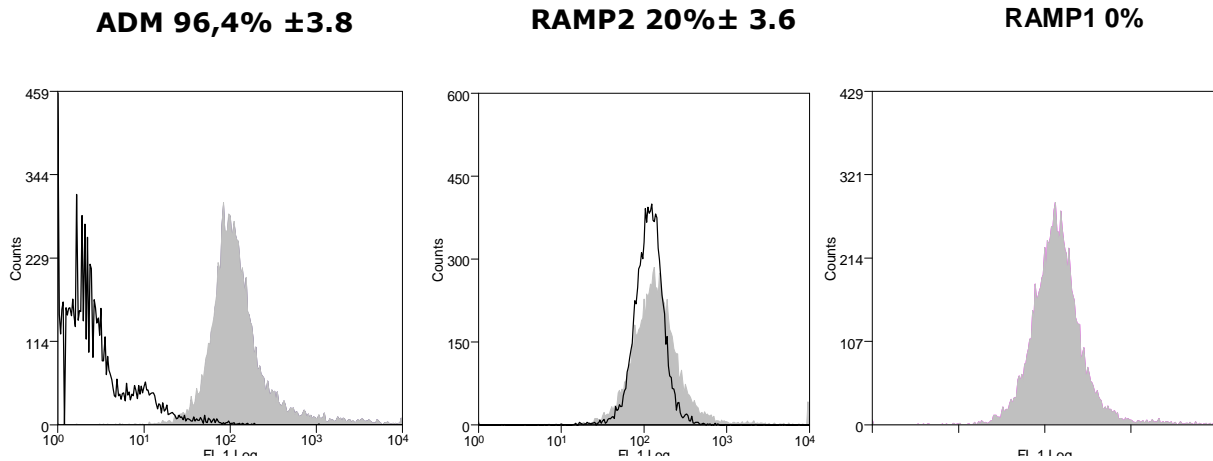


Figura 6. Espressione del sistema adrenomedullinico nelle cellule HL60. A: RT-PCR. B: Western Blot effettuato con anticorpi anti-GAPDH (1:500), -ADM (1:200), -RAMP1 (1:200), -RAMP2 (1:200) e -CRLR (1:200). C: citofluorimetria (profilo nero: controllo isotipico; profilo grigio: trattato con anticorpo di interesse). I risultati, media di 3 esperimenti, sono espressi come percentuale rispetto al controllo isotipico \pm DS.

Tuttavia, l'espressione quantitativa di ADM e dei suoi recettori variava con il tempo di coltura. Come si può osservare nella figura 7, l'espressione di ADM era elevata a 24 h, si riduceva a circa un terzo a 72 h e ritornava ai valori iniziali a 7 giorni. Un andamento opposto si osservava, invece, per RAMP2 e RAMP1, la cui espressione era bassa o assente, rispettivamente, a 24 h, aveva un picco a 72 h e scendeva poi a 7 giorni. Questi risultati suggeriscono che ADM venga prima accumulata all'interno delle cellule HL60 e successivamente secreta in modo massivo, come evidenziato dalla diminuzione di espressione rilevata alle 72 h. La secrezione probabilmente avviene tramite un meccanismo di esocitosi, come già osservato in altri tipi cellulari (Kato et al, 1995), e si può supporre che sia accoppiata con l'esposizione sulla membrana plasmatica del sistema recettoriale. In

tal modo, ADM sarebbe in grado di sostenere ed amplificare i suoi effetti autocrini. Questa ipotesi può trovare una parziale conferma dal fatto che a 7 giorni l'accumulo intracellulare di ADM era accompagnato da una diminuzione dell'espressione di RAMP2 e RAMP1.

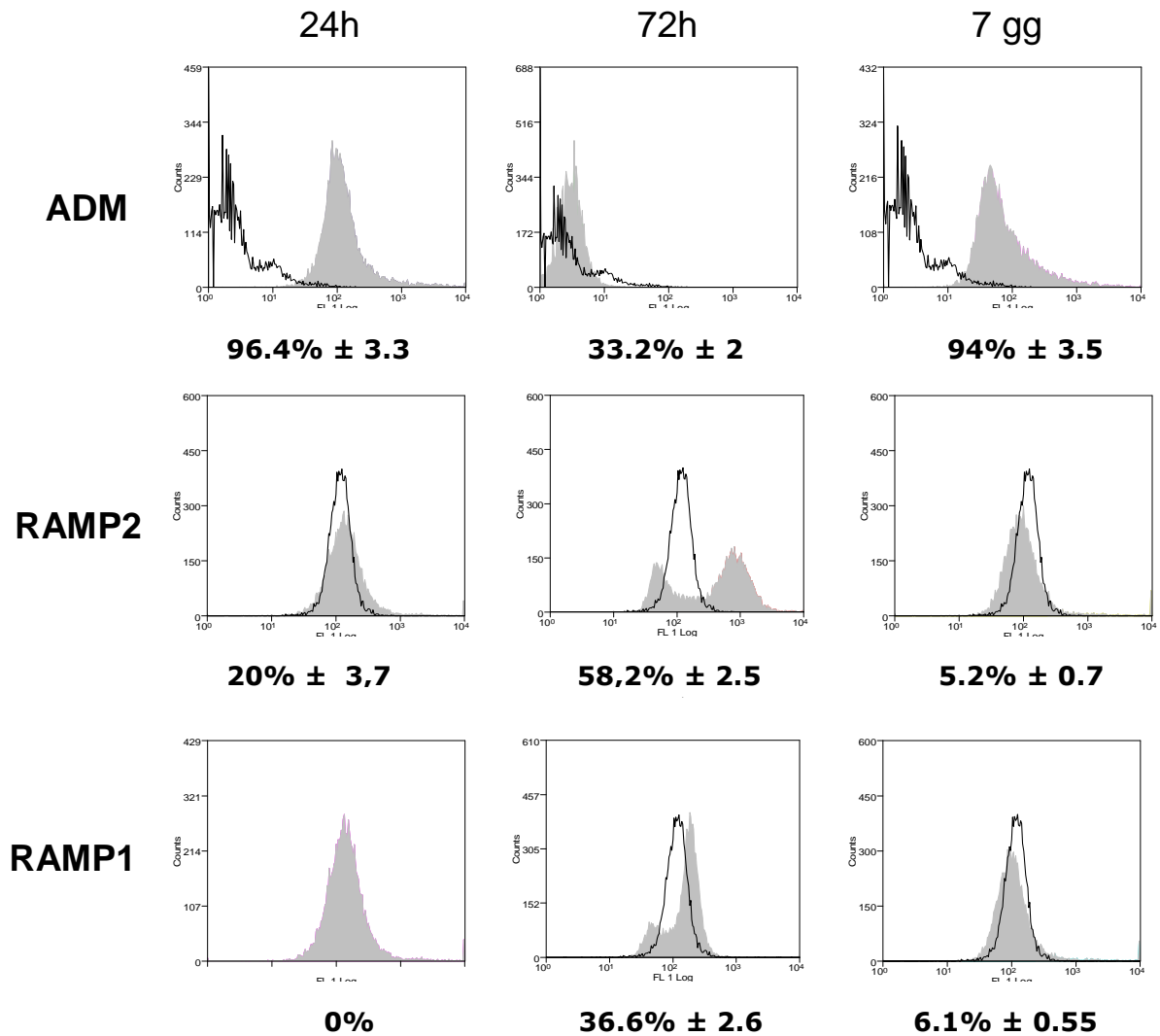


Figura 7. Analisi citofluorimetrica del sistema adrenomedullinico in cellule HL60 a diversi tempi di coltura. I risultati, media di 3 esperimenti, sono espressi come percentuale rispetto al controllo isotipico ± deviazione standard. (Profilo nero: controllo isotipico; profilo grigio: trattato con anticorpo di interesse).

Analogamente a quanto già dimostrato in altri tipi cellulari (Miyashita et al., 2003; Belloni et al., 2003; Iwasaki et al., 1998), ADM esercitava un forte effetto proliferogeno. Infatti, tutte le concentrazioni testate aumentavano in modo significativo la crescita cellulare rispetto ai controlli non trattati (Figura 8). In particolare, la concentrazione più efficace era pari a $5 \times 10^{-8} \text{M}$ e, per tal motivo, è stata utilizzata nella sperimentazione successiva.

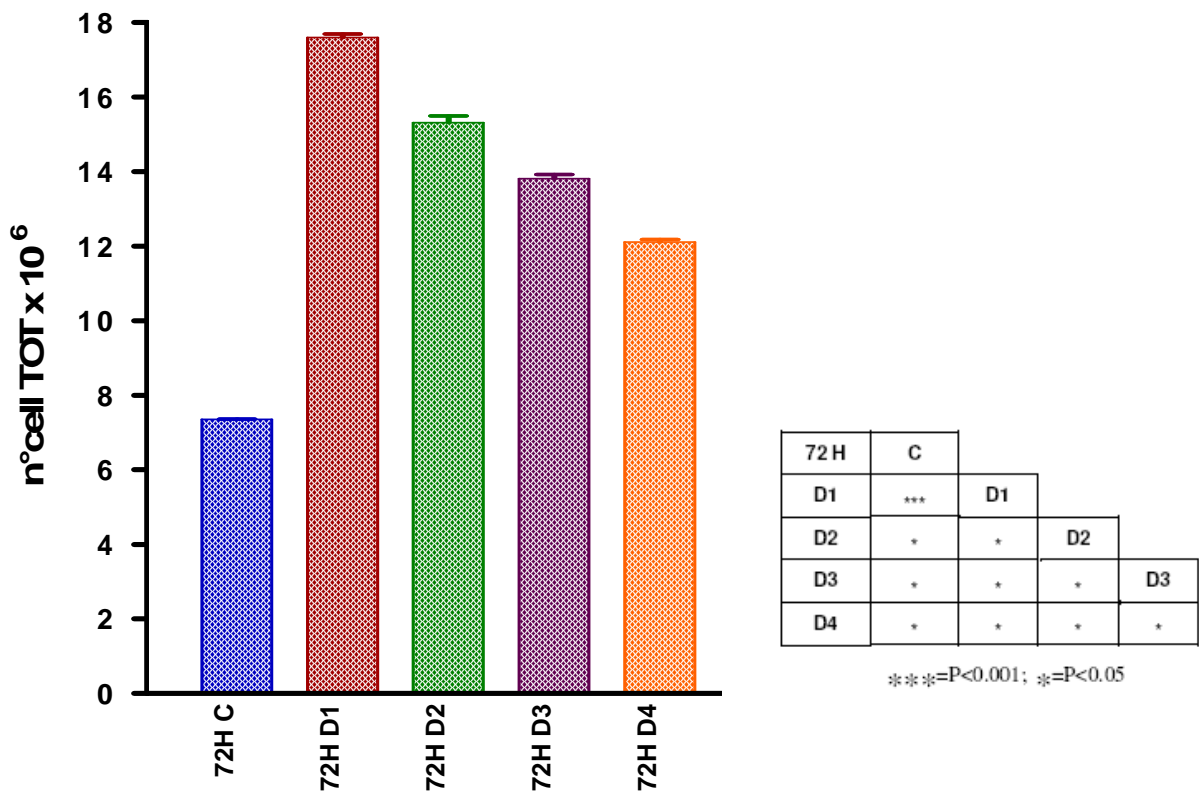


Figura 8. Crescita delle cellule HL60 dopo 72 h di incubazione con ADM alle seguenti concentrazioni: $5 \times 10^{-8} \text{M}$ (D1), $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$ (D2), $1.25 \times 10^{-8} \text{M}$ (D3) e $0.625 \times 10^{-8} \text{M}$ (D4). I risultati, media di 3 esperimenti, sono espressi come numero di cellule $\times 10^6 \pm \text{DS}$. C: colture non trattate.

Come evidenziato in figura 9, l'aumento della proliferazione cellulare indotto da ADM veniva completamente reversato dal contemporaneo trattamento con il Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂, peptide derivato da ADM e in grado di legarsi al sistema recettoriale di ADM agendo da agonista o da antagonista in dipendenza del tipo cellulare (Andreis et al., 2000). In questo caso, l'incubazione con il solo inibitore non ha modificato la crescita cellulare rispetto al controllo, suggerendo che nelle HL60 il peptide funzioni come un antagonista del recettore di ADM.

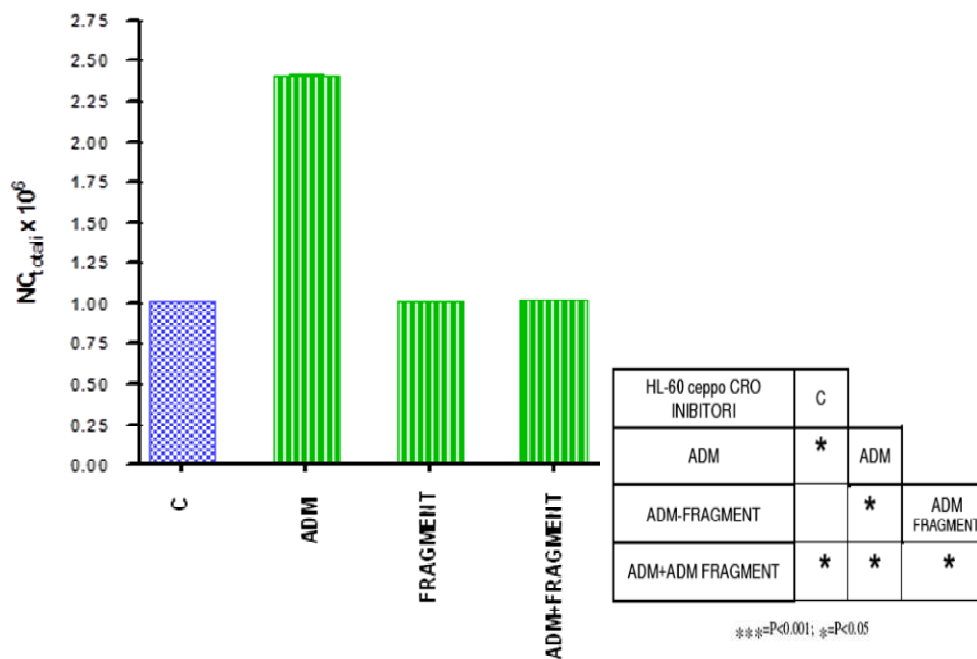


Figura 9. Crescita delle cellule HL60 dopo 72 h di incubazione con 5×10^{-8} M ADM, 5×10^{-7} M Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ (FRAGMENT) o con entrambi. I risultati, media di 3 esperimenti, sono espressi come numero di cellule $\times 10^6 \pm$ DS. C: colture non trattate.

E' stato, inoltre, valutato se gli effetti osservati sulla crescita cellulare potessero essere messi in relazione anche con una modulazione dell'espressione basale di ADM e dei suoi recettori. In tutti i campioni analizzati ADM e RAMP2 erano presenti come mRNA (Figura 10) e come proteina (Figura 11 e 12). In quest'ultimo caso, l'analisi

citofluorimetrica ha evidenziato, in seguito a trattamento con ADM o con il suo inibitore, delle differenze rispetto alle colture non trattate (Figura 7). I risultati ottenuti indicano che ADM esogena modula in modo negativo il sistema adrenomedullinico. Infatti, inibisce la produzione di ADM endogena, la sua secrezione e, in parte, l'espressione dei suoi recettori. A 24 h si rilevava una quantità minore di ADM (39.8% in meno rispetto alle colture non trattate), e a 72 h l'accumulo intracellulare della proteina era superiore a quello determinato nei controlli. Inoltre, il peptide esogeno induceva l'espressione di RAMP1 a 24 h e, contrariamente a quanto osservato per il sistema endogeno, una diminuzione dell'espressione del sistema recettoriale a 72 h.

Il trattamento con Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ non ha modificato l'andamento fasico di espressione del sistema endogeno, ma ha determinato variazioni quantitative sia di ADM che dei suoi recettori. Infatti, a 24 h induceva una riduzione del peptide intracellulare pari al 44.5% rispetto alle colture non trattate. Parallelamente si osservava una riduzione del 23% nell'espressione di RAMP2. A 72 h veniva aumentata l'espressione del sistema recettoriale, nella misura del 16% per RAMP2 e del 30.6% per RAMP1. Quest'ultimo dato suggerisce che RAMP1 possa mediare, direttamente o indirettamente, gli effetti biologici del Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂.

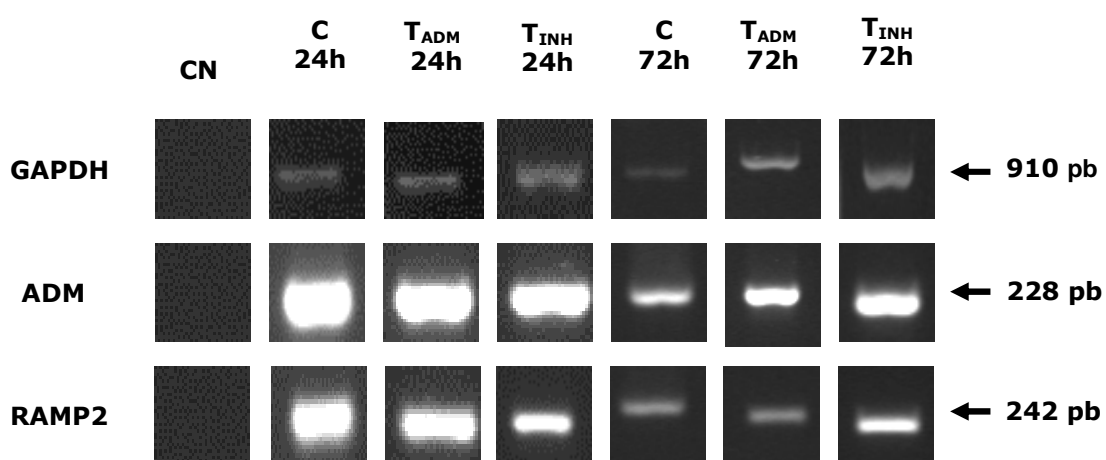


Figura 10. RT-PCR di estratti di cellule HL60 trattate con 5×10^{-8} M ADM o 5×10^{-7} M Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ (INH) per 24 e 72 h. Controllo negativo (CN); colture non trattate (C); trattati con ADM e Fragment inhibitor₂₂₋₅₂ (ADM, INH).

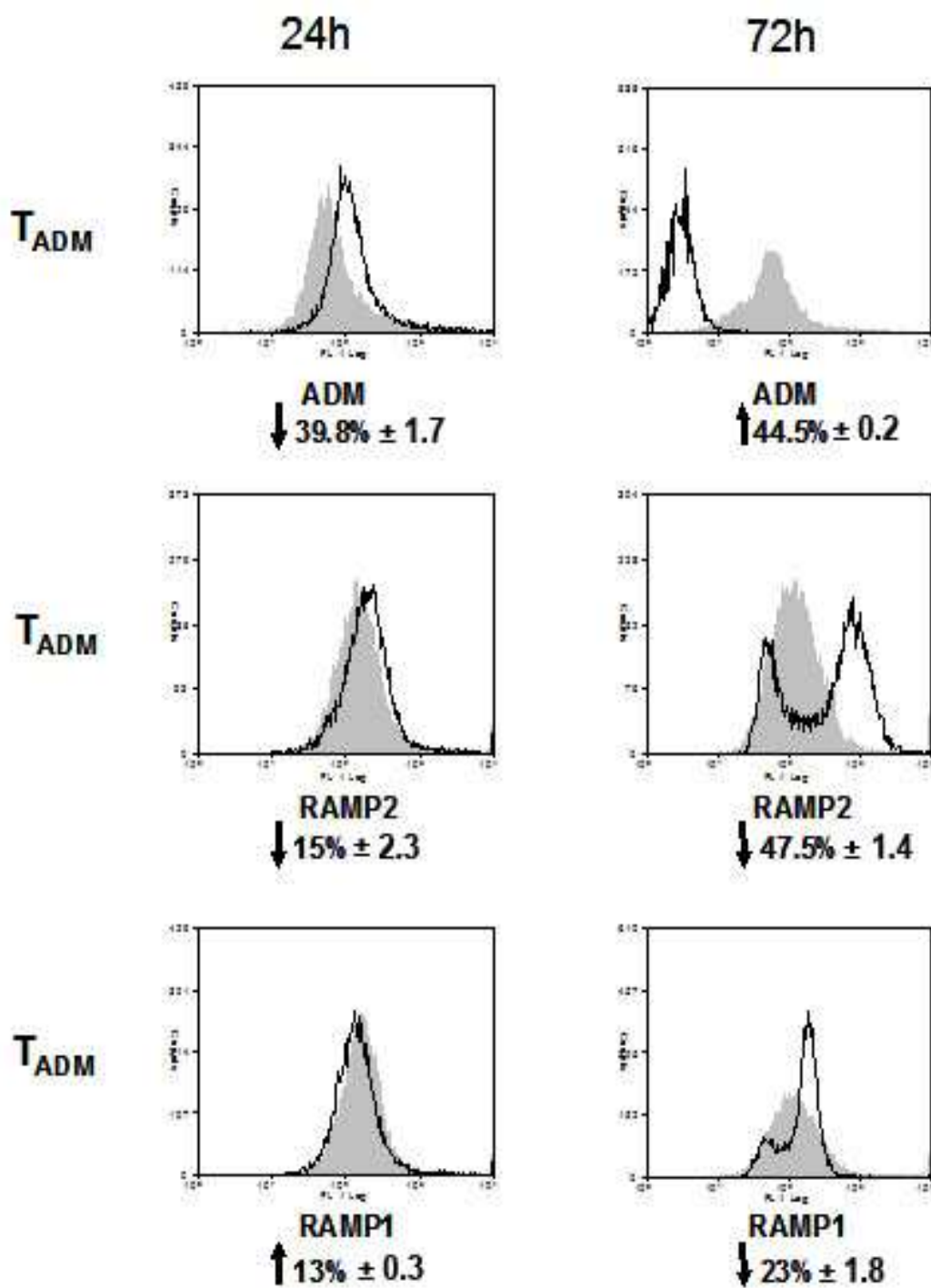


Figura 7. Analisi citofluorimetrica del sistema adrenomedullinico in cellule HL60 trattate con 5×10^{-8} M ADM per 24 e 72 h. I risultati, media di 3 esperimenti, sono espressi come percentuale rispetto alle colture non trattate \pm deviazione standard.

(Profilo nero: controllo non trattato; profilo grigio: trattato con ADM)

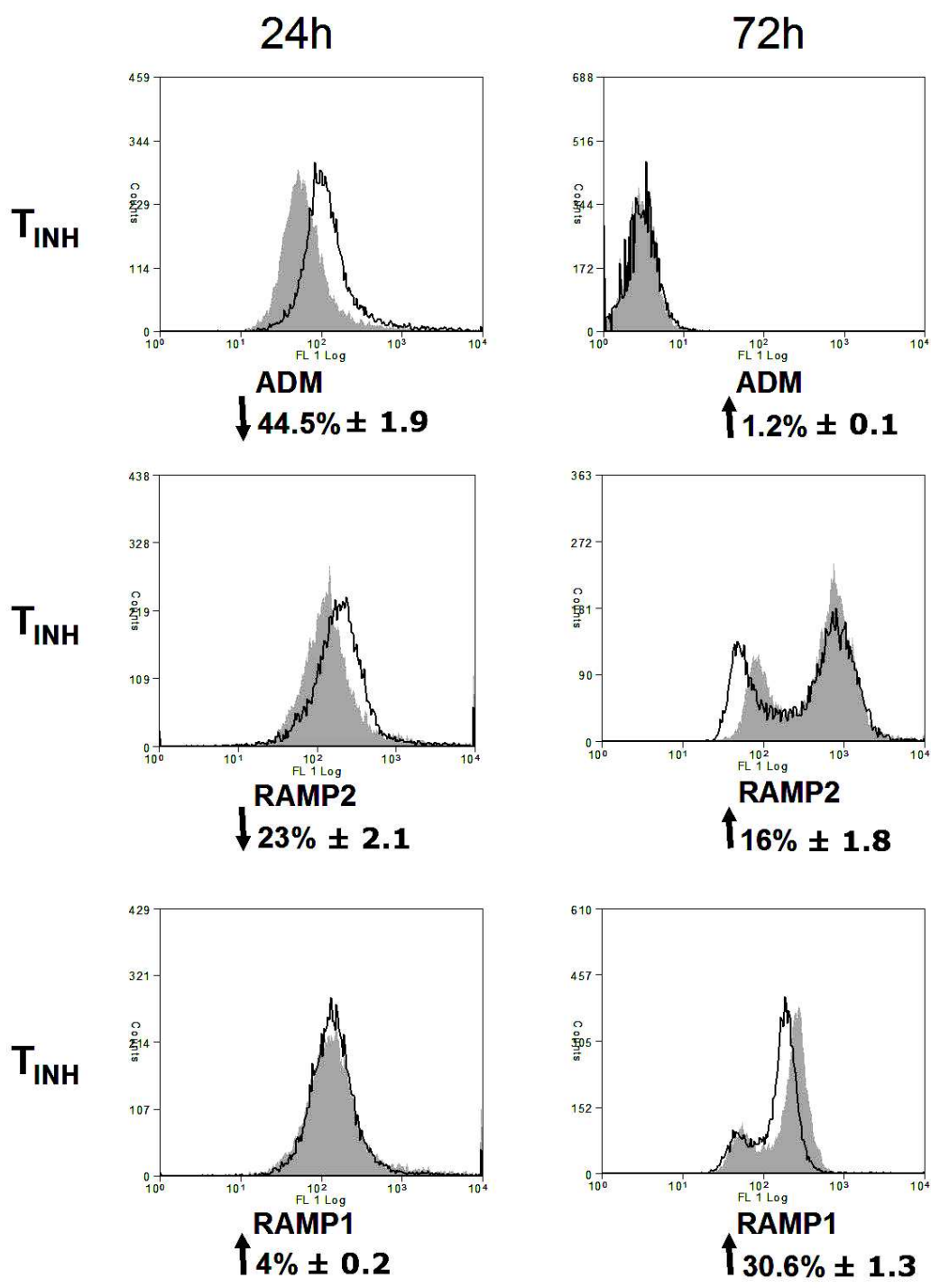


Figura 8. Analisi citofluorimetrica del sistema adrenomedullinico in cellule HL60 trattate con 5×10^{-7} M Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ per 24 e 72 h. . L'istogramma di colore grigio indica lo spostamento rispetto all'istogramma bianco (relativo alle cellule non trattate). I risultati, media di 3 esperimenti, sono espressi come percentuale rispetto alle colture non trattate \pm deviazione standard. (Profilo nero: controllo non trattato; profilo grigio: trattato con il Fragment inhibitor 22-52)

Gli effetti sul differenziamento cellulare sono stati valutati tramite analisi citofluorimetrica di colture trattate per 72 h e 7 giorni con ADM o con il suo inibitore. A tal fine, sono stati presi in considerazione marcatori relativi al differenziamento in senso monocitario e granulocitario. Il CD13 è un'amminopeptidasi di membrana legante zinco che viene espressa sulla superficie dei precursori dei granulociti/monociti e delle loro forme mature (Wickström et al., 2011). Il CD14, espresso nei macrofagi e monociti, agisce principalmente come co-recettore (assieme al recettore Toll-like 4) per il riconoscimento del lipopolisaccaride di origine batterica ed il legame di altre molecole patogene ad esso associate (Tapping et al., 2000). Il CD127 è una sottounità del recettore per l'interleuchina 7, che gioca un ruolo importante nello sviluppo dei linfociti maturi (Roifman et al., 2000).

Le cellule HL60, mantenute in coltura per 7 giorni senza eseguire alcun cambio di terreno, tendevano a differenziare, come dimostrato dai più elevati livelli di espressione dei marcatori a 7 giorni rispetto a quanto determinato a 72 h (Tabella 6). Questo dato è in accordo con precedenti evidenze sperimentali che avevano dimostrato come la linea cellulare HL60 sia in grado di differenziarsi spontaneamente in cellule mature della linea granulocitaria e monocitaria (Trayner et al., 1998). Si può ipotizzare che le cellule secernano nel terreno di coltura fattori che, con un meccanismo autocrino/paracrino, attivano vie di segnale inducenti il differenziamento cellulare. Non è da escludere che anche l'ADM endogena possa contribuire a tale modulazione.

Marcatore	Espressione (%)±DS
CD 2	47±2.1
CD11b	10±1.6
CD11c	4±0.5
CD14	14±1.1
CD38	8±2.1
CD45	12.4±1.4
CD66	44±2.5
CD66b	42±2
CD13	28±0.7
CD45RA	0
CD127	43±1.8
CD235	94±3.4

Tabella 6. Analisi citofluorimetrica di marker di differenziamento granulocitario e monocitario in cellule HL60 coltivate per 72 h e 7 giorni. I risultati, media di 3 esperimenti, sono espressi come rapporto percentuale tra colture a 7 giorni e colture a 72 h ± deviazione standard.

Quest'ultima ipotesi può trovare una parziale conferma nei risultati ottenuti in seguito a trattamento per 72 h con ADM, dai quali si evidenzia come il peptide diminuisca in modo marcato i livelli di espressione dei marcatori di differenziamento rispetto alle colture non trattate (Tabella 7). Accoppiando questa indicazione con l'andamento dell'espressione di ADM endogena (Figura 7), si può pensare che il picco di secrezione di ADM endogena a 72 h contribuisca a mantenere le cellule HL60 in uno stato indifferenziato, mentre a 7 giorni, in cui il peptide viene accumulato all'interno della cellula e il sistema recettoriale è espresso a bassi livelli, le cellule rispondano ad altri fattori di tipo differenziativo presenti nel terreno. Per confermare questa ipotesi sarà necessario determinare la quantità di peptide presente nel terreno ai vari tempi di coltura.

I risultati ottenuti, quindi, indicano chiaramente che il trattamento con ADM per 72 h inibisce l'evoluzione delle cellule HL60 in fenotipi più maturi. Al contrario, e come atteso, l'incubazione delle colture con

Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ per 72 h determinava un aumento dei livelli di espressione dei marcatori di differenziamento. Si può ipotizzare che tale effetto sia una conseguenza non solo di un'azione antagonista nei confronti di RAMP2 e di una diminuita produzione di ADM endogena, ma anche di un coinvolgimento di RAMP1. Al tempo 7gg, l'immunofenotipo delle cellule HL60 trattate con ADM risultava confrontabile con quello del controllo, suggerendo che il trattamento richiede, probabilmente, una stimolazione continua nel tempo per avere significativi effetti regolatori a lungo termine. Al contrario, l'effetto induttivo verso la linea granulocitaria era ancora rilevabile nelle colture trattate con Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂

Marcatore	ADM/CTR T72h vs C72h	ADM/CTR T7gg vs C7gg	INH/CTR T72h vs C72h	INH/CTR T7gg vs C7gg
CD 2	13.7±1.1	0	11±0.8	0
CD11b	↓ 38±2.3	0	10.4±0.7	0
CD11c	↓ 48±1.7	2.5±0.2	44±2.2	2.8±0.2
CD14	↓ 14±0.8	0	↓ 10±0.6	0
CD38	↓ 76±2.5	0	73.8±2.3	2.6±0.1
CD45	↓ 62±2.1	0	45.5±1.8	14.4±1.3
CD66	↓ 40±2	14.2±1.1	0	9±0.7
CD66b	12.2±1.7	0	35±2	0
CD13	7±1.2	0	3.4±0.2	0
CD45RA	↓ 46±1.6	10.6±0.9	36±1.5	5.8±0.3
CD127	11.4±0.7	0	18±0.9	0
CD235	↓ 62±1.8	0	74±2.6	0

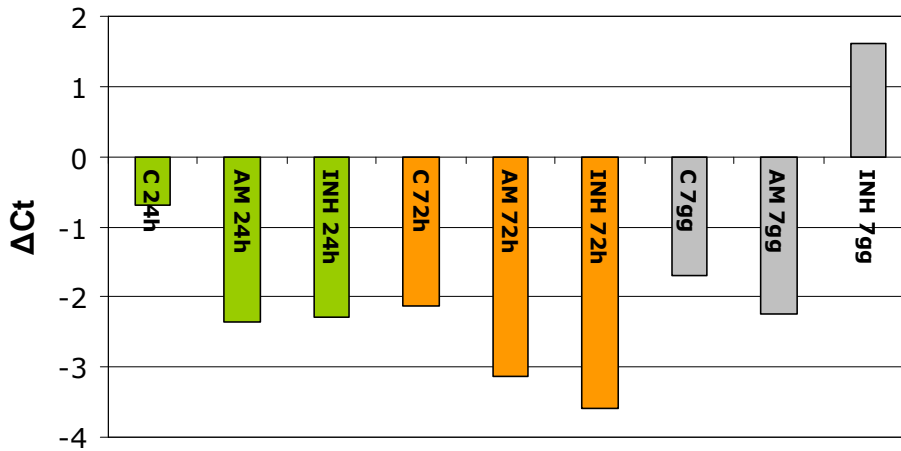
Tabella 7. Analisi citofluorimetrica di marker di differenziamento granulocitario e monocitario in cellule HL60 coltivate in presenza o in assenza di con 5X10⁻⁸ M ADM o 5X10⁻⁷ M Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ per 72 h e 7 giorni. I risultati, media di 3 esperimenti, sono espressi come rapporto percentuale tra colture trattate e corrispondenti colture di controllo ± DS.

Kohroki (2001) e Guibal (2002) hanno dimostrato che il trattamento con ATRA modifica l'espressione di Cul5, gene regolatore del processo differenziativo delle cellule promielocitiche. Cul5 è un membro della famiglia del gene cullina e si caratterizza per la presenza del dominio carbossi-terminale Cul. Baxter e collaboratori (2009) hanno

dimostrato che l'espressione di Cul5 aumenta durante il differenziamento granulocitario della linea cellulare HL60 e la sua sovraespressione è correlata all'inibizione della proliferazione in linee cellulari quali COS-1, CHO e T47D.

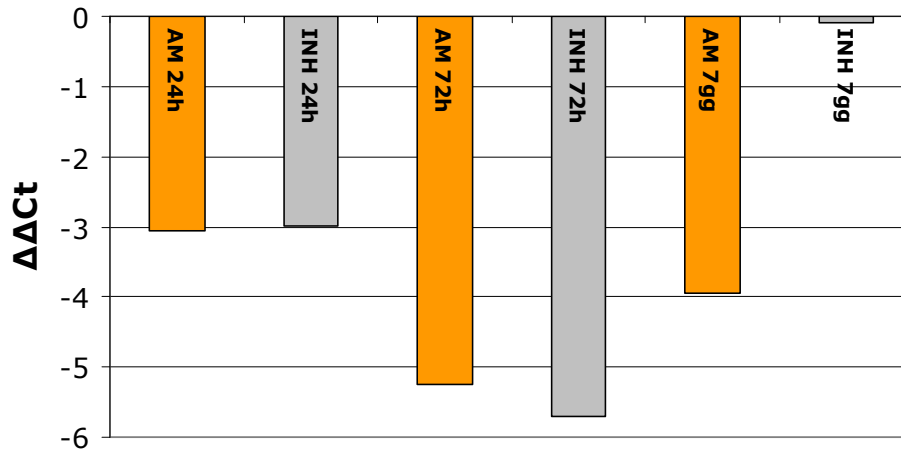
Nel presente studio, l'analisi mediante qPCR dimostrava che il livello di espressione di Cul5 varia durante il tempo di coltura, come dimostrato dalla progressiva e significativa riduzione trascrizionale dalle 24 h alle 72 h (Figure 13A e B). È interessante notare come questo andamento concordi con le evidenze precedentemente riportate relative all'espressione basale del sistema adrenomedullinico. Si può ipotizzare che l'aumento della secrezione di ADM e dell'espressione dei suoi recettori a 72 h induca la proliferazione e inibisca la differenziazione tramite una modulazione dell'espressione di Cul5. In accordo con questa ipotesi, il trattamento con ADM determinava un'ulteriore riduzione del livello di espressione di Cul5. Simili risultati si ottenevano in seguito a trattamento con Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ per 72 h. Tuttavia, a 7 giorni si osservava una maggiore espressione di Cul5 rispetto a quanto rilevato nei controlli e nei campioni trattati con ADM. Tale evidenza avvalorerebbe l'ipotesi di un effetto induttivo in senso differenziativo del Fragment Inhibitor₂₂₋₅₂ su cellule HL60. Successivi studi saranno eseguiti per meglio caratterizzare il meccanismo di azione di ADM e del suo inibitore e per dimostrare eventuali analogie con la regolazione indotta da ATRA.

Cul-5



A

Cul-5



B

Figura 13. Analisi di espressione del gene Cul5 mediante qPCR su cellule HL60 trattate con ADM e *fragment inhibitor*₂₂₋₅₂ a differenti intervalli di tempo (24h, 72h e 7gg). I risultati sono espressi come (A) ΔCt ovvero differenza tra il Ct del gene target e quello del gene calibrator e (B) $\Delta\Delta Ct$ ovvero differenza tra il Ct del gene target nei campioni trattati con ADM e *fragment inhibitor*₂₂₋₅₂ e quello del campione di controllo al tempo corrispondente.

CONCLUSIONI

Collettivamente, i risultati raccolti in questa tesi suggeriscono un possibile coinvolgimento di ADM nella patogenesi di forme leucemiche e/o nel mantenimento del blocco differenziativo caratteristico di tali patologie. Nelle cellule HL60, il sistema adrenomedullare appariva in grado di autoregolarsi mediante un controllo della secrezione di ADM, dell'espressione dei suoi recettori e di geni, quali il Cul5. Inoltre, l'espressione di ADM è correlata ad una stimolazione della proliferazione cellulare e ad una inibizione della formazione di fenotipi maturi. Tali effetti vengono annullati o reversati in seguito al blocco del recettore. Sulla base di tali evidenze, si può ipotizzare che la modulazione del sistema adrenomedullare possa rappresentare una possibile strategia terapeutica per il trattamento delle forme leucemiche. Per confermare i dati ottenuti e quindi sostenere tale ipotesi, verrà effettuato un analogo studio su blasti ottenuti da pazienti leucemici.

BIBLIOGRAFIA

- Adams GB, Scadden DT (2006). The hematopoietic stem cell in its place. *Nature Immunol.*7:333-337.
- Andreis PG, Markowska A, Champion HC, Mazzocchi G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. (Jun 2000). Adrenomedullin enhances cell proliferation and deoxyribonucleic acid synthesis in rat adrenal zona glomerulosa: receptor subtype involved and signaling mechanism. *Endocrinology.* 2000 Jun;141(6):2098-104.
- Baxter SS, Carlson LA, Mayer AMS, Hall ML, Fay J. (2009). Granulocytic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells is associated with increased expression of Cul5. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 45: 264-274.
- Belloni AS, Andreis PG, Rossi GP, Mingrino A, Champion HC, Kadowitz PJ, Murphy WA, Coy DH, Nussdorfer GG (1998). Inhibitory effect of adrenomedullin (ADM) on the aldosterone response of human adrenocortical cells to angiotensin-II: role of ADM(22-52)-sensitive receptors. *Life Sci*, 63(26):2313-2321.
- Belloni AS, Albertin G, Forneris ML, Nussdorfer GG (2001). Proadrenomedullin-derived peptides as autocrina-paracrine regulators of cell growth. *Histol Histopathol*, 16(4):1263-1274.
- Belloni AS, Trejter M, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. (February 2003). Adrenomedullin stimulates proliferation and inhibits apoptosis of immature rat thymocytes cultured in vitro. *Peptides*, 24(2): 295-300.
- Bene M. et al. (1995). Proposal for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the immunological characterization of leukemias (EGIL). *Leukemia* 9(10): p. 1783-1786.

- Bernasconi C (2010). Cellule staminali tumorali: il vero bersaglio nella cura dei tumori. Corso di formazione avanzata "Progressi in medicina e Biologia".
- Betz BL, Hess JL (2010). Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Arch Pathol Lab Med.* 134:1427:1432.
- Bhatia M (2001). AC133 expression in human stem cells. *Leukemia*, 15(11):1685-1688.
- Bonnet D, Dick JE (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Med*, 3: 730–737.
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*; 425:841-846.
- Carlo-Stella C, Mangoni L, Dotti GP, Rizzoli V. (1995). Techniques for detection of minimal residual disease. *Leuk Lymphoma*. 18 Suppl 1:75-80. Review.
- Catovsky D. and M.E. (1992). The classification of acute leukaemia. *Leukemia*, 1992.6 (suppl 2): p. 1-6
- Chakravarty P, Suthar TP, Coppock HA, Nicholl CG, Bloom SR, Legon S, Smith DM (2000). CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) in rat tissues. *Br J Pharmacol*, 130(1):189-195.
- Champion HC, Nussdorfer GG, Kadowitz PJ (1999). Structure-activity relationships of adrenomedullin in the circulation and adrenal gland. *Regul Pept*, 85:1-8.
- Cheson BD (2004). Overview of the revised response criteria for acute myelogenous leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2(5):277-9
- Chini EN, Choi E, Grande JP, Burnett JC, Dousa TP (1995). Adrenomedullin suppresses mitogenesis in rat mesangial cells via cAMP pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 215(3):868-

873.

- Chun TH, Itoh H, Saito T, Yamahara K, Doi K, Mori Y, Ogawa Y et al. (2000). Oxidative stress augments secretion of endothelium-derived relaxing peptides, C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *J Hypertens*, 18, 575–580.
- Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. (2008). Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. 2008;322:1861-1865.
- Consolini R, Legitimo A, Calleri A (2001). La cellula staminale ematopoietica: biologia e applicazioni cliniche. *Pathologica*, 93:2-14.
- Dalerba P. and Clarke M.F. (2007). Cancer stem cell and tumor metastasis: first step into uncharted territory. *Stem cell*, 1,3: 241-242.
- De Angeli S, Del Pup L, Febas E, Conconi MT, Tommasini M, Di Liddo R, Albertin G, Parnigotto PP, Nussdorfer GG (2004). Adrenomedullin and endothelin-1 stimulate in vitro expansion of cord blood hematopoietic stem cells. *Int J Mol Med*, 14(6): 1083-1086.
- De Lima M, Strom SS, Keating M, Kantarjian H, Pierce S, O'Brien S, Freireich E, Estey E (1997). Implications of potential cure in acute myelogenous leukemia: development of subsequent cancer and return to work. *Blood.*, 90(12):4719-24
- Del Pup L, Belloni AS, Carraro G, De Angeli S, Parnigotto PP, Nussdorfer GG (2003). Adrenomedullin is expressed in cord blood hematopoietic cells and stimulates their clonal growth. *Int J Mol Med*, 11(2): 157-160.
- Dick JE (1996): Normal and leukemic human stem cell assayed in SCID mice. *Semin Immunol*, 8(4):197-206
- Ehlenz K., Koch B., Preuss P., Simon B., Koop I., Lang R.E. (1997). High levels of circulating adrenomedullin in severe

illness: correlation with C-reactive protein and evidence against the adrenal medulla as site of origin. *Exp Clin Endocrinol Diabets* 105: 156-162.

- Fauser AA, Messner HA (1979). Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophilis in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts. *Blood*, 53(5):1023-1027.
- Ferrero E, Malavasi F (1997). Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and aplysian ADP-ribosyl cyclase. *The journal of immunology*. 159 (8): 3858–65.
- Filippatos GS, Gangopadhyay N, Lalude O, Parameswaran N, Said SI, Spielman W, Uhal BD (2001). Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. ;281(4):L749-61.
- Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, et al. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell*. ;2:274-283
- Foord SM, Marshall FH (1999). RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 20(5):184-187.
- Freireich EJ, Gehan EA, Sulmand D, Boggs DR, Frei E (1961). The effect of chemotherapy on acute leukemia in the human. *J Chronic Dis*, 14:593-608
- Ghio R (1989). Le tecniche di coltura in vitro dei progenitori ematopoietici umani. Da Sitia R Ed: *Colture Cellulari*. Scuola Superiore di Oncologia e Scienze Biomediche, Santa Margherita Ligure.

- Gibbons C, Dackor R, Dunworth W, Fritz-Six K, Caron KM. (2007). Receptor activity-modifying proteins: RAMPing up adrenomedullin signaling. *Mol Endocrinol.* Apr;21(4):783-96.
- Grimwade D.(2007). Impact of cytogenetics on clinical outcome in AML. In: Karp JE, ed. *Acute Myelogenous Leukemia*. Totowa, New Jersey: Humana Press:177-192.
- Guibal FC, Moog-Lutz C, Smolewski P, Di Gioia Y, Darzynkiewicz Z, Lutz P, Cayre YE. (2001). ASB-2 inhibits growth and promotes commitment in myeloid leukaemia cell. *J. Biol. Chem.* 277: 218-224.
- Hay DL, Poiner DR, Sexton PM. (2006). GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther*; 109: 173-197.
- Hernández-Caselles T, Martínez-Esparza M, Pérez-Oliva AB, *et al.* (January 2006). A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *Journal of Leukocyte Biology.* 79 (1): 46–58.
- Hinson JP, Kapas S, Smith DM (2000). Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*, 21: 138-167.
- Hojo Y, Ikeda U, Ohya K, Ichida M, Kario K, Takahashi M, Ikeda M, Minota S, Isumi Y, Minamino N, Ishimitsu T, Shimada K (2001). Interaction between monocytes and vascular endothelial cells induces adrenomedullin production. *Atherosclerosis*, 155(2): 381-387.
- Hough MR, Rosten PM, Sexton TL, Kay R, Humphries RK (July 1994). Mapping of CD24 and homologous sequences to multiple chromosomal loci. *Genomics* 22 (1): 154-61.
- Huntington ND, Tarlinton DM (2005). CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunology Letters.* **94** (3): 167–74.
- Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, Hino J, Matsuoka H, Kitamura K, Eto T, Matsuo H (1994). Genomic structure of

- human adrenomedullin gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 203: 631-639.
- Isumi Y, Shoji H, Sugo S, Tochimoto T, Yoshioka M, Kangawa K, Matsuo H, Minamino N. (1998). Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology*, 139(3): 838-846.
 - Iwasaki H, Eguchi S, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. (Aug 1998). Adrenomedullin as a novel growth-promoting factor for cultured vascular smooth muscle cells: role of tyrosine kinase-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology*. 139(8):3432-41.
 - Janowska-Wieczorek A, Majta M, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2001). Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells*, 19(2):99-107.
 - Jougasaki M, Burnett JC Jr (2000). Adrenomedullin: potential in physiology and pathophysiology. *Life Sci*, 66(10): 855-872.
 - Kapas S, Catt KJ, Clark AJ (1995). Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor. *J Biol Chem*, 270(43): 25344-25347 .
 - Kapas S, Clark AJ (1995). Identification of an orphan receptor gene as a type 1 calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 217(3): 832-838.
 - Kato H, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y (1997). Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. *Endocrinology*, 138(6):2615-2620.
 - Katoh F, Kitamura K, Niina H, Yamamoto R, Washimine H, Kangawa K, Yamamoto Y, Kobayashi H, Eto T, Wada A. (1995). Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), an endogenous anticholinergic peptide: its exocytotic secretion and inhibition of catecholamine secretion in adrenal medulla. *J Neurochem*. 1995 Jan;64(1):459-61.

- Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T et al. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 121: 1009-1121.
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y Nakamura S, Matsuo H, Eto T (1993). Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 192:553-560.
- Kitamura K, Kangawa K, Ishiyama Y, Washimine H, Ichiki Y, Kawamoto M, Minamino N, Matsuo H, Eto T (1994). Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP). *FEBS Lett*, 351:35-37.
- Klitz W, Maiers M, Spellman S, Baxter-Lowe LA, Schmeckpeper B, Williams TM, and Fernandez-Vina M (2003). New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens* 62 (4): 296-307.
- Kohroki J, Fujita S, Itoh N, Yamada Y, Imai H, Yumoto N, Nakanishi T, Tanaka K. (2001). ATRA-regulated ASB-2 gene induced in differentiation of HL-60 leukemia cells. *FEBS Lett*. 505: 223-228.
- Kubo A Minamino N, Isumi Y, Kangawa K, Dohi K, Matsuo H (1998). Adrenomedullin production is correlated with differentiation in human leukemia cell lines and peripheral blood monocytes. *FEBS Lett*, 426: 233-237.
- Lewis LK, Smith MW, Brennan SO, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG (1997). Degradation of human adrenomedullin(1-52) by plasma membrane enzymes and identification of metabolites. *Peptides*, 8(5):733-9.
- *Lezioni di Ematologia di Sante Tura*, sesta edizione, 2003.

- Lord BI, Testa NG, Hendry JH (1975). The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood*; 46:65-72.
- Löwenberg B, Downing JR, Burnett A (1999). Acute myeloid leukaemia. *Medical Progress*, 341:1051-62.
- Mayack SR, Wagers AJ. (2008). Osteolineage niche cells initiate hematopoietic stem cell mobilization. *Blood*. 2008;112:519-531.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 393(6683): 333-339.
- McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temeles DS, Zsebo KM, Clark SC Quesenberry PJ (1989). Detection of a human CFC with a high proliferate potential. *Blood*, 74:609-15.
- Miraglia S, Godfrey W, Buck D (1998). A response to AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood*, 91(11): 4390-4391.
- Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. (2003). The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev. Jun*;17(2):71-97.
- Miyashita K, Itoh H, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurugi T, Nakao K. (2003). Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells. *Hypertension Research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*. 26 Suppl:S93-8.
- Moore MA (1991). Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood*, 78(1):1-19.

- Morrison SJ, Spradling AC (2008). Stem cells and niches: mechanism that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132:598-611.
- Muff R, Born W, Fischer JA (2001). Adrenomedullin and related peptides: receptors and accessory proteins. *Peptides*, 22(11):1765-1772.
- Mukherjee S, Raje N, Schoonmaker JA, et al. (2008). Pharmacologic targeting of a stem/progenitor population in vivo is associated with enhanced bone regeneration in mice. *J Clin Invest.* ; 118:491-504 a.
- Murakami O., Takahashi K., Satoh F., Totsune K., Sone M., Arihara Z., Andoh N., Mouri T. (1998). Expression of adrenomedullin and adrenomedullin mRNA in ectopic ACTH-secreting tumors. *Eur J. Endocrinol* 138:436-439.
- Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Murakami H, Sasano H, Shirato K, Shibahara S (1999). Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis. *Clin Sci*, 97(2): 247-251.
- Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. (2001). Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood.*; 97:2293-2299.
- Nussdorfer GG, Rossi GP, Mazzocchi G (1997). Role of adrenomedullin and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides*, 18: 1079-1089.
- Nussdorfer GG (2001). Proadrenomedullin-derived peptides in the paracrine control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Int Rev Cytol*, 206: 249-284.
- Oehler MK, Norbury C, Hague S, Rees MC, Bicknell R (2001). Adrenomedullin inhibits hypoxic cell death by upregulation of Bcl-2 in endometrial cancer cells: a possible promotion mechanism for tumour growth. *Oncogene*, 20(23): 2937-2945.

- Ogawa M (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cell. *Blood*, 81: 2844-2853.
- Ohlstein et al.(2004). The stem cell niche: theme and variation, *Current Opinion in Cell Biology*. 16:693-699.
- Okuno Y, Iwasaki H, Huettner CS, *et al.* (2002). Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 99 (9): 6246–51.
- Perry JM, Li L (2007). Disrupting the stem cell niche: good seeds in bad soil. *Cell*; 129:1045-1047.
- Pinto A, Zagonel V, Ferrara F (2001). Acute myeloid leukemia in the elderly: biology and therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol Hematol*. Sep;39(3):275-87. Review.
- Pirtskhalaishvili G, Hrebinko RL, Nelson JB (2001). The treatment of prostate cancer: an overview of current options. *Cancer Pract.*;9(6):295-306.
- Ploemacher RE, Van der Sluijs JP, Voerman JS, Brons NH (1989). An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood*, 74(8): 2755-2763.
- Roifman CM, Zhang J, Chitayat D, Sharfe N (2000). A partial deficiency of interleukin-7R alpha is sufficient to abrogate T-cell development and cause severe combined immunodeficiency. *Blood* 96 (8): 2803–7.
- Rombouts EJ, Pavic B, Lowenberg B, Ploemacher RE. (2004). Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood.*; 104:550-557.
- Samson WK (1999). Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu Rev Physiol*, 61:363-389.

- Sanz M. and A. (1996). Sampere Immunophenotyping of AML and MDS and detection of residual disease. *Baillieres Clin Haematol* 9(1): P35-55.
- Sata M, Kakoki M, Nagata D, Nishimatsu H, Suzuki E, Aoyagi T, Sugiura S, Kojima H, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Omata M, Nagai R, Hirata Y (2000). Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension*, 36(1): 83-88.
- Scadden DT (2007). The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 20(1): 19-27,2007.
- Schymeinsky J, Mócsai A, Walzog B. (2007). Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thrombosis and Haemostasis*. 98 (2): 262–73.
- Scoffield J. (1976) Open mouths get kids' interest. *Dent Stud*; 54(4):43, 56.
- Shinoki N, Kawasaki T, Minamino N, Okahara K, Ogawa A, Ariyoshi H, Sakon M et al. (1998). Shear stress down-regulates gene transcription and production of adrenomedullin in human aortic endothelial cells. *J Cell Biochem*, 71, 109–115.
- Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP. (Jul 1996). CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology.*;60(1):106-17.
- Smith C. (2003). Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer control*, 10(1): 9-16.
- Stier S, Ko Y, Forkert R et al. (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*; 201:1781-1791.
- Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, Matsuo H (1995). Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem*

- Biophys Res Commun, 207(1): 25-32.
- Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood*, 74: 1563-1569.
 - Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(9): 3584-3588.
 - Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press.
 - Tapping RI, Tobias PS (2000). Soluble CD14-mediated cellular responses to lipopolysaccharide. *Chemical Immunology and Allergy* 74: 108–21.
 - Till JE, McCulloch EA (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14:213.
 - Trayner ID, Bustorff T, Etches AE, Mufti GJ, Foss Y, Farzaneh F. (Jun 1998). Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid, alpha1,25-dihydroxyvitamin D3 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leuk Res*. 22(6):537-47.
 - Tura - Lezioni di Ematologia di Esculapio Medicina
 - Uzan B, Ea HK, Launay JM, Garel JM, Champy R, Cressent M, Lioté F. (2006). A critical role for adrenomedullin-calcitonin receptor-like receptor in regulating rheumatoid fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *J Immunol*. May 1;176(9):5548-58.
 - Van Beers EJ, Schaap MC, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF, Meijers JC, Biemond BJ; CURAMA study

- group. (2009) Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica*. Nov: 94(11):1513-9.
- Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, et al. (2007). A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell*. 15: 223-228.
 - Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J. (2011). Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Science*. Mar:102(3):501-8.
 - Wilkins A, Yang W, Yang J (2003). Structural biology of the cell adhesion protein CD2: from molecular recognition to protein folding and design. *Current Protein and Peptide Science* 4 (5): 367-73.
 - Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, Essers MA, Macdonald HR, Trumpp A. (2007). Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann N Y Acad Sci*. Jun;1106:64-75.
 - Withers DJ, Coppock HA, Seufferlein T, Smith DM, Bloom SR, Rozengurt E (1996). Adrenomedullin stimulates DNA synthesis and cell proliferation via elevation of cAMP in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett*, 378(1): 83-87.
 - Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332(6163): 411-415.
 - Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H, Morrison SJ. (May 2006) Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*. 25;441(7092):475-82.
 - Yoon J, Terada A, Kita H. (Dec 2007). CD66b regulates adhesion and activation of human eosinophils. *J Immunol*. 15;179(12):8454-62.

- Young NS, Gerson SL et al. (2006). *Clinical Hematology*. Mosby Elsevier
- Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ascensao JL, MacKintosh FR, Flake AW (1997). Transplantation of hematopoietic stem cells in utero. *Stem Cells*, 15 Suppl 1:79-92.
- Ziegler BL, Valtiri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C (1999). KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Scienze*, 285(5433): 1553-1558.
- Zudaire E, Cuttitta F, Martinez A (2003). Regulation of pancreatic physiology by adrenomedullin and its binding protein. *Regul Pept*, 112, 121–130a.

