



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA**

Dottorato di Ricerca in

SCIENZE DELLO SVILUPPO E MEDICINA DELLA PROGRAMMAZIONE

INDIRIZZO EMATOONCOLOGIA ED IMMUNOLOGIA

CICLO XXII

**CELLULE STAMINALI TUMORALI:**

**RUOLO DELLA *SIDE POPULATION* NEI TUMORI SOLIDI**

**Direttore della Scuola  
Supervisore**

Ch.mo Prof. Giuseppe Basso  
Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Dottorando: dott.ssa Chiara Frasson**

2007-2009



*Per aspera sic itur ad astra*  
(Seneca, *Hercules furens*, atto II, v. 437)



# RIASSUNTO

## CELLULE STAMINALI TUMORALI: RUOLO DELLA *SIDE POPULATION* NEI TUMORI SOLIDI

Molti studi negli ultimi anni hanno dimostrato che alcune forme di tumore sono caratterizzate dalla presenza di cellule con specifiche proprietà *stem-like*, dette anche cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells/CSCs*). Queste cellule sono considerate le cellule “inizianti” il tumore e sono probabilmente le responsabili delle recidive del tumore. Le CSCs hanno la capacità di auto-rinnovarsi, la potenzialità di dare origine a una o più specie cellulari all’interno del tumore e l’abilità di guidare, in modo continuo, la proliferazione delle cellule maligne. Molti studi hanno descritto il potenziale tumorigenico delle CSCs fino ad arrivare alla formulazione della *cancer stem cell (CSC) hypothesis*, secondo la quale a sostenere la crescita del tumore e a causare recidive, sarebbe una ristretta popolazione cellulare (Jordan CT et al. 2006).

Sono stati proposti due diversi approcci per caratterizzare le CSCs all’interno del tumore: il primo utilizza marcatori di superficie selettivamente espressi dalle CSCs, ma non dalla maggior parte delle cellule tumorali; il secondo approccio sfrutta alcune caratteristiche funzionali della cellula, come la peculiare capacità di colorarsi con coloranti specifici. In particolare, questo secondo metodo è utilizzato per l’identificazione, tramite citometria a flusso, della cosiddetta Side Population (SP), distinta sulla base della capacità di queste cellule di estrarre il colorante vitale Hoechst 33342 (Goodell MA et al 1996). Le cellule SP rappresentano solo una piccola frazione di tutta la popolazione di cellule e, data la loro capacità di estrarre farmaci, esse rappresentano la frazione chemio-resistente all’interno del tumore (Hirschmann-Jax C et al. 2004). Inoltre le SP sembrano essere una fonte arricchita di cellule staminali (Challen GA et al. 2006).

I tumori solidi rappresentano la maggior parte delle patologie maligne ed i tumori epiteliali ne costituiscono circa l’80% (Visvader JE e Lindeman GJ 2008). L’origine della maggior parte dei tumori solidi è sconosciuta, ma è stato ipotizzato che sottotipi diversi sottendono a cellule inizianti il tumore differenti. Inoltre ci sono evidenze crescenti che diversi tumori solidi siano organizzati in modo gerarchico e sostenuti da una sottopopolazione distinta di CSCs (Visvader JE e Lindeman GJ 2008).

Un primo studio ancora in corso ha valutato il ruolo e le caratteristiche delle cellule staminali tumorali, in particolare della sottopopolazione SP, in linee cellulari di Medulloblastoma (MDB). Il MDB è uno dei più comuni tumori solidi pediatrici a livello del sistema nervoso centrale e dati recenti hanno dimostrato che anche il MDB sembra originare da una componente staminale. Abbiamo cercato di isolare la sottopopolazione con caratteristiche *stem-like* per capire quale *pathway* fosse principalmente coinvolto nel mantenimento della componente staminale (CSCs/SP). I primi dati ottenuti suggeriscono che nelle linee di MDB è presente una componente staminale e che la via di PI3K/AKT/mTOR è cruciale per la sopravvivenza delle cellule SP, che hanno una elevata capacità di formare colonie *in vitro*.

Una sempre maggiore esperienza nella tecnologia e nel setting del FACS (*Flow Activated Cell Sorter*) sorter ha permesso di estendere l'approccio sperimentale ad altri tipi di tumore e quindi di identificare le SP sia in cellule primarie di carcinoma ovarico che in cellule, sempre di carcinoma ovarico, xenotrapiantate in topi NOD/SCID e di indagare gli effetti che l' IFN- $\alpha$  ha sulle cellule tumorali. Questo è stato l'obiettivo di un secondo studio condotto nel Dipartimento di Oncologia e Scienze Chirurgiche di Padova in collaborazione con il nostro laboratorio. I nostri risultati mostrano che l'IFN- $\alpha$  ha effetti antiproliferativi e proapoptotici sulla componente SP, che si traducono in un potenziale effetto terapeutico contro quei tumori caratterizzati da una elevata percentuale di cellule SP. Questi risultati suggeriscono che lo screening dei campioni di tessuto tumorale per il loro contenuto di SP potrebbe costituire la base per la somministrazione di IFN- $\alpha$  ai pazienti con tumore ovarico ed eventualmente con altri tumori solidi. Nel corso dell'ultimo anno la nostra ricerca si è concentrata anche sulla caratterizzazione delle CSCs in linee cellulari e in colture primarie sia di medulloblastoma (MDB) che di glioblastoma (GBM).

E' noto che il microambiente o nicchia del tumore influenza la distribuzione della CSCs all'interno della massa tumorale e la loro resistenza alle radiazioni. Ci sono alcune evidenze che l'ipossia può favorire l'espansione delle cellule staminali e il mantenimento del tumore (Moserle L. et al 2009, Blazek et al 2007, Platet N. et al. 2007). Inoltre, studi preclinici e clinici indicano che c'è una relazione inversa tra andamento del tumore e ipossia (Nordsmark M. et al.2005).

Sulla base di queste considerazioni, nello studio sul medulloblastoma (MDB) abbiamo indagato il legame tra il microambiente ipossico e alcune vie del segnale (Notch1; HIF-1 $\alpha$ ) che sembrano essere coinvolte nel sostenere la crescita delle cellule di MDB. I primi risultati indicano chiaramente che le cellule di MDB possono essere espanse con successo *in vitro* solo in un contesto di ipossia.

Nello studio sul Glioblastoma (GMB), abbiamo sfruttato la chirurgia immagine-guidata per cercare di definire differenti aree intra-tumorali per capire se ci fosse una distribuzione eterogenea delle cellule correlata al gradiente di ossigeno all'interno del GBM. I nostri risultati mostrano che le cellule più immature, identificate con il marcatore di staminalità CD133, sono localizzate nella parte interna e in quella intermedia della massa tumorale, mentre le cellule più differenziate sono distribuite lungo la zona periferica e maggiormente vascolarizzata. Questi risultati indicano una stretta correlazione tra il gradiente di ipossia intra-tumorale, il fenotipo delle cellule tumorali e la resistenza del tumore alla chemioterapia, portando alla formulazione di un nuovo modello di distribuzione delle cellule staminali nella nicchia del tumore, che potrebbe essere utili per definire con più precisione la reale localizzazione della cellule tumorali chemio-resistenti nel GBM, al fine di elaborare strategie di trattamento più efficaci.

L'ultima parte di questa tesi, che esula dagli argomenti trattati sopra, si è focalizzata sullo studio del ruolo che la IL-23 esercita sulle cellule di leucemia linfoblastica acuta-B (LLA-B). Questo studio è stato condotto principalmente nella Unità di Immunologia del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Laboratorio dell' Istituto G.Gaslini di Genova.

La Leucemia linfoblastica acuta (LLA) è una patologia in cui il blocco della differenziazione, l'iperproliferazione e una apoptosi difettosa risultano in un accumulo aberrante di un clone cellulare. Le LLA-B rappresentano l'85% dei casi delle leucemie infantili e vengono distinte in diversi sottotipi a seconda dello stadio maturativo della cellula linfoide (Cobaleda C. e García Sánchez-I . 2009, Onciu M.

2009). Nonostante i progressi degli ultimi anni nello sviluppo di trattamenti sempre più efficaci sono comunque in corso ulteriori studi per capire quali siano gli eventi specifici che portano alla leucemia, per migliorare l'approccio clinico e identificare terapie che possano ridurre le recidive della malattia.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare l'espressione e la funzione del recettore della IL-23 (IL23R) nelle cellule di leucemia acuta B pediatrica (LLA-B) rispetto alla controparte normale e verificare se la IL-23 potesse esercitare una azione anti tumorale diretta sulle cellule di leucemia B e se si quale fosse il meccanismo coinvolto. I primi risultati ottenuti dimostrano che IL-23R è up-regolato nelle cellule primarie di LLA-B rispetto alla controparte normale e che la IL-23 media direttamente la crescita tumorale *in vitro* e *in vivo* attraverso l'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali e l' induzione della apoptosi. Pertanto, in linea di principio, la IL-23 potrebbe essere un buon farmaco da testare in trial di fase I in pazienti pediatrici affetti da LLA-B che non rispondono alle attuali terapie.

# SUMMARY

## CELLULE STAMINALI TUMORALI: RUOLO DELLA *SIDE POPULATION* NEI TUMORI SOLIDI

Many studies performed over the past years have shown that some forms of human cancers are characterized by stem-like-cells (cancer stem cells, CSCs) with specific stem-cell properties. These cells are currently considered as “tumour-initiating“ cells, responsible of tumour relapse. CSCs have the capacity for self-renewal, the potential to develop into any cell and the proliferative ability to drive continued expansion of malignant cells. Many studies have described the rather heterogeneous tumorigenic potential of CSCs and led to the development of the cancer stem cells hypothesis that postulates that only a fraction of cells within a tumour is endowed with stem cells-like features, giving rise to all the other components of the tumour (Jordan CT et al. 2006).

Two different approaches to identify CSCs within tumours have been proposed: the first one tracks specific surface markers that are selectively expressed on CSCs but not on the bulk of tumour cells; the second approach exploits some functional characteristics, such as a unique pattern of staining with certain dyes, to identify stem-like cells. In particular this latter method is used for the detection by dual-wavelength flow cytometry of the so-called side population (SP) on the basis of the ability of these cells to efflux the fluorescent dye Hoechst 33342 (Goodell MA et al 1996). The SP cells represent only a small fraction of the whole cell population and given their ability to efflux drugs, they represent the multi-drug resistant cell fraction within tumours (Hirschmann-Jax C et al. 2004). Moreover, SP cells seem to be an enriched source of stem cells (Challen GA et al. 2006).

Solid tumours account for the major cancer burden, and epithelial cancers constitute approximately 80% of all cancers (Visvader J.E. and Lindeman G.J. 2008). The cellular origins of most solid tumours are largely unknown, but it has been speculated that different tumour subtypes reflect distinct cells of origin at the time of tumour initiation. Moreover there is increasing evidence that diverse solid tumours are hierarchically organized and sustained by a distinct subpopulation of CSCs (Visvader J.E. and Lindeman G.J. 2008).

A first ongoing study has evaluated the role and the characteristics of cancer stem cells, in particular of the SP cell subset, in Medulloblastoma (MDB) cell lines. MDBs are the most common paediatric solid tumours occurring in the central nervous system (CNS) and recent data have shown that also MDB arises from stem-like cells. We have tried to isolate the subset with stem-like cell properties and to understand which signaling pathway is mainly involved in the CSCs/SP maintenance. First data strongly suggest that MDB cell lines encompass stem-like cells and that the PI3K/AKT/mTOR pathway is crucial for the survival of the SP cells, which have a high capacity to form colonies *in vitro*.

The increased experience in FACS sorter technologies and setting has allowed to well identify SP cells in both primary ovarian cancer cells cultured *in vitro* and xenografted in nude mice and also to investigate

the effects of IFN- $\alpha$  on this tumour cell subset. This was the aim of a second study led in the Departments of Oncology and Surgical Sciences of Padua in collaboration with our laboratory. Our findings show that IFN- $\alpha$  exerts marked antiproliferative and proapoptotic effects on the SP subset, which translates into a therapeutic effect against tumours bearing large amounts of SP cells. These results suggest that screening tumour samples for their SP content could form the basis for rationale-based administration of IFN- $\alpha$  to patients with ovarian cancer and possibly other solid tumours.

In the last year our research has also focused on the characterization of the CSCs population in brain tumor cell lines and in primary cultures of both Medulloblastoma and Glioblastoma.

The tumour microenvironment influences distribution of CSCs within the tumour mass and their resistance to radiation. There are some clues that hypoxia can favour stem cells expansion and maintenance in tumours (Moserle L. et al 2009, Blazek et al 2007, Platet N. et al. 2007). Moreover, preclinical and clinical studies show that local tumour control after radiotherapy inversely correlates with tumour hypoxia (Nordsmark M. et al.2005).

Based on these considerations, in the Medulloblastoma (MDB) study we have investigated the link between the hypoxic microenvironment and some molecular pathway (i.e. Notch1 signaling; HIF-1 $\alpha$ ) that seem to be involved in the maintenance of primary MDB derived cells. First results clearly indicate that MDB derived cells can be successfully expanded *in vitro* only by preserving them into a hypoxic context.

In the Glioblastoma (GMB) study we have exploited image guided surgery to sample multiple intra-tumoral areas to define potential cellular heterogeneity in correlation to the oxygen tension gradient within the GBM mass. Our results indicate that more immature cells, identified with the stem cell marker CD133, are localized in the inner core and in the intermediate layer of the tumour mass, while more committed cells are distributed along the peripheral and neo-vascularised area. These results indicate a correlation between the intra-tumoral hypoxic gradient, the tumour cell phenotype and the tumour resistance to chemotherapy, leading to a novel concentric model of tumour stem cell niche, which may be useful to define the real localization of the chemo-resistant GBM tumour cells in order to design more effective treatment strategies.

The last part of this work, different from those discussed above, is focused on the study of the role that IL-23 exert on the B-acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL) cells. This study was mainly conducted in the A.I.R.C. Tumor Immunology Unit of the Department of Experimental and Laboratory Medicine, G.Gaslini Institute of Genova. B-cell acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL) is a clonal malignant disease originated from a single cell and characterized by the accumulation of blast cells that are phenotypically reminiscent of normal stages of B-cell differentiation (Cobaleda C. and Sánchez-García I. 2009; Onciu M. 2009). Steady progress in development of effective treatments has led to a cure rate of more than 80% in children, creating opportunities for innovative approaches (Pui CH et al. 2006). Studies are underway to ascertain the precise events that take place in the genesis of acute lymphoblastic leukaemia, to enhance the clinical application of known risk factors and anti-leukemic agents, and to identify treatment regimens that reduce relapse. The aim of this study was to investigate the potential direct anti-tumour activity of IL-23 in paediatric B-acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL) cells and the molecular mechanisms involved.

First results demonstrate that IL-23 possesses anti-leukemic activity on B-ALL cells. We show for the first time that IL-23R is up-regulated in primary B-ALL cells as compared to normal early B lymphocytes, and that IL-23 dampens directly tumour growth *in vitro* and *in vivo* through inhibition of tumour cell proliferation and induction of apoptosis. Therefore, in principle, IL-23 may be a good candidate drug to be tested in a phase I trial in childhood B-ALL patients otherwise unresponsive to current therapeutic standards.

## INDICE

|   |         |
|---|---------|
| Introduzione generale   | Pag. 1  |
| Le cellule staminali  | Pag. 1  |
| Le cellule staminali tumorali   | Pag. 4  |
| La <i>Side Population</i>   | Pag. 9  |
| Bibliografia  | Pag. 14 |
| Scopo della tesi  | Pag. 19 |
| Parte I   | Pag. 21 |
| LY294002 inhibits cancer-stem cells clonogenicity in medulloblastoma cell lines                       |         |
| Parte II  | Pag. 37 |
| The Side Population of Ovarian Cancer Cells Is a Primary Target of IFN- $\alpha$<br>Antitumor Effects |         |
| Parte III   | Pag. 51 |
| Medulloblastoma stem cells activation: role of Notch1 signalling activation under<br>hypoxia          |         |
| Parte IV  | Pag. 63 |
| Intratumoral hypoxic gradient drives stem cell distribution and MGMT expression in<br>glioblastoma    |         |
| Parte V   | Pag. 75 |
| IL-23 acts as anti-tumour agent on childhood B-acute lymphoblastic leukaemia cells                    |         |



# INTRODUZIONE

## Le cellule staminali

Nonostante gli enormi progressi compiuti nella ricerca sul cancro, ci sono ancora una serie di domande aperte. Ad esempio, che cosa fa sì che alcuni tumori siano più difficili da eradicare di altri? Perché ci sono alcuni tumori più resistenti alla terapia? E perché alcuni tumori sono più aggressivi e altri non lo sono ?

Per tentare di rispondere a queste domande l'attenzione si è concentrata sulle cellule staminali, che potrebbero essere il target della trasformazione maligna in quanto caratterizzate da una lunga *lifespan*, quindi in grado di accumulare mutazioni che portano poi alla trasformazione cellulare (1,2) e in grado di “sostenere” il processo di tumorigenicità avendo la capacità di dividersi in modo indefinito (3).

Il tessuto normale è caratterizzato da un'organizzazione gerarchica che comprende una piccola frazione di cellule staminali, come riserva, e tutti i diversi tipi di cellule che costituiscono l'eterogeneità del tessuto e che derivano da esse.

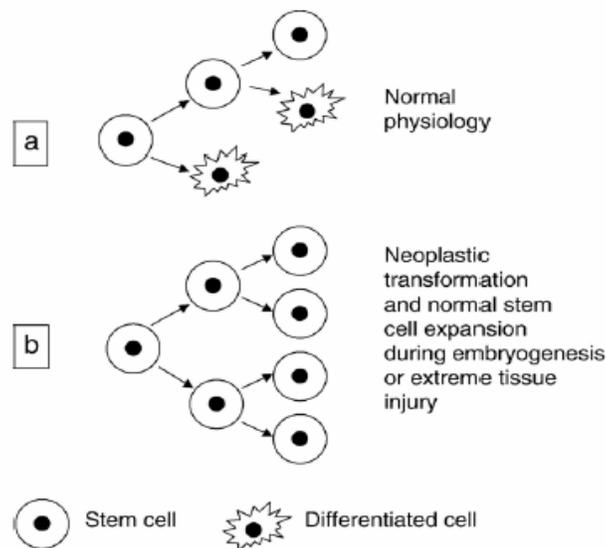
Le cellule staminali sono cellule primitive, non specializzate, dotate della singolare potenzialità di differenziarsi in qualunque altro tipo di cellula del corpo. Esse possiedono due caratteristiche fondamentali che le distinguono dalle altre cellule:

- la loro abilità di auto-rinnovarsi, quindi la capacità di compiere un numero illimitato di cicli replicativi mantenendo il medesimo stadio differenziativo;
- la multipotenza, cioè la capacità di dare origine ad una o più specie cellulari.

Le cellule staminali sono normalmente cellule quiescenti (blocco in fase  $G_0$  del ciclo cellulare) o caratterizzate da un ciclo cellulare lento (2), mantenute in uno stato indifferenziato finché non è richiesta la loro partecipazione nella normale fisiologia della cellula. La divisione asimmetrica delle cellule staminali porta alla formazione di una cellula staminale identica alla cellula madre, che mantiene così costante il pool di cellule staminali e una cellula progenitrice parzialmente differenziata e incapace di autorinnovamento (quindi non staminale), ma dotata di un ampio potenziale replicativo. Questa strategia, che limita il numero di eventi replicativi a cui una cellula staminale va incontro, si fonda probabilmente su due importanti principi tra loro collegati:

- stretto controllo del numero di cellule staminali: ogni cellula staminale occupa una propria *nicchia* biologica definita da un complesso *network* di segnali biochimici, che probabilmente forniscono anche alla cellula staminale le informazioni necessarie sul momento opportuno per replicarsi;
- conservazione dell'integrità del genoma delle cellule staminali: un basso numero di replicazioni riduce il rischio di danni al DNA, cioè di mutazioni.

Fisiologicamente è molto importante che venga mantenuto un numero costante di cellule staminali e, fatta eccezione per la fase di espansione che si ha nell'embriogenesi o per la fase di riparazione di gravi danni ai tessuti, è proprio la divisione asimmetrica delle cellule staminali a permettere che ciò avvenga (Figura 1).



**Figura 1:** *Importanza del mantenimento di un numero costante di cellule staminali nella fisiologia normale rispetto alla trasformazione maligna. Nella fisiologia normale, in assenza dell'espansione durante l'embriogenesi e di gravi danni ai tessuti, la divisione asimmetrica delle cellule staminali permette di mantenere un numero costante (a). Nella trasformazione maligna, i meccanismi che controllano la normale divisione delle cellule staminali sono persi e quindi si osserva un aumento, incontrollato, del numero di cellule (b). (Hadnagy A et al., 2006)*

Le mutazioni a carico delle cellule staminali sono estremamente pericolose, poiché vengono trasmesse a tutte le generazioni di cellule figlie derivate dalla cellula staminale stessa. Al contrario una mutazione in una cellula progenitore si ripercuote solo su di una singola generazione di cellule che, eventualmente, dopo un certo tempo verrà comunque sostituita. Inoltre tali alterazioni possono indurre la cellula staminale a degenerare in senso neoplastico, diventando così una cellula staminale tumorale (4), cioè una tipologia

di cellula probabilmente responsabile del continuo rifornimento di nuove cellule tumorali che caratterizza lo sviluppo e soprattutto le recidive dei tumori.

Le cellule staminali si classificano anche secondo la provenienza, come adulte o embrionali (5):

- le **cellule staminali adulte** sono cellule non specializzate, reperibili tra le cellule specializzate di un tessuto specifico e sono prevalentemente multipotenti. Sono dette più propriamente *somatiche* (dal Greco σωμα *sōma* = corpo), perché non provengono necessariamente da adulti, ma anche da bambini o cordoni ombelicali;
- le **cellule staminali embrionali** sono ottenute a mezzo di coltura, ricavate dalle cellule interne di una blastocisti. Già nel 1858 Rudolf Virchow propose l'ipotesi che il cancro originasse da cellule staminali embrionali. Questo concetto, basato sulle similarità istologiche di tumori e tessuti embrionali, fu esteso da Cohnheim e Durante i quali suggerirono che i tessuti adulti contengano residui embrionali che normalmente rimangono in forma dormiente, ma che possono attivarsi diventando tumorali (6).

La riparazione tissutale conseguente ad un danno e lo sviluppo della ghiandola mammaria durante la gravidanza sono alcuni esempi nei quali, nella normale fisiologia, sono coinvolte le cellule staminali (5,7). Cellule staminali sono state descritte in molti tessuti normali come la mammella (7,8), il fegato (9) ed il cervello (10).

Nel SNC, ad esempio, le cellule staminali sono responsabili dell'origine di neuroni, astrociti ed oligodendrociti. Durante l'embriogenesi si trovano soprattutto nella *Ventricular zone* (VZ = una delle due aree germinali del cervelletto, che ne forma lo strato più profondo a livello del quale si trovano le cellule progenitrici); mentre dopo la nascita cellule staminali multipotenti si possono ancora trovare in alcune regioni, incluso il cervelletto e l'ippocampo.

Mentre è ormai chiaro il ruolo delle cellule staminali nella fisiologia normale, è più recente l'evidenza del loro coinvolgimento nella trasformazione maligna.

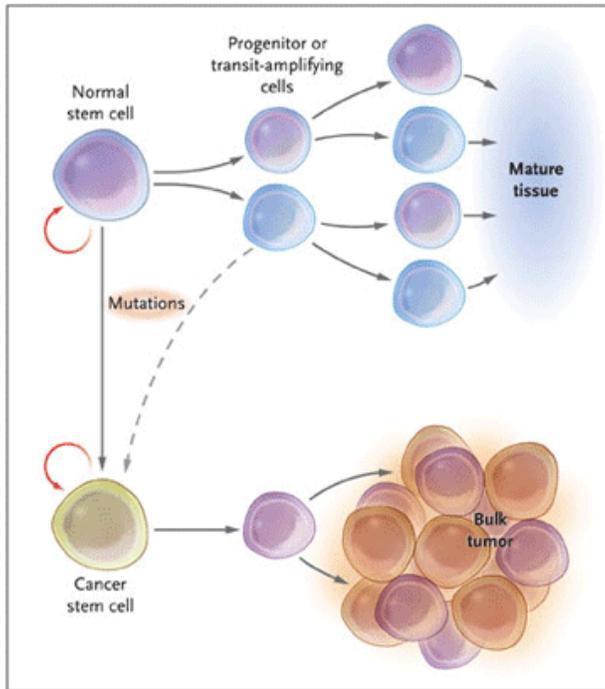
## Le cellule staminali tumorali

Studi degli ultimi anni hanno dimostrato che le caratteristiche del “sistema” cellula staminale e le proprietà specifiche di questo *subset* di cellule sono cruciali in alcune forme di tumore tanto da portare ad applicare il concetto di cellula staminale anche nel campo dell'oncologia. Secondo questa teoria, il tumore sarebbe composto da un certo numero di cellule più differenziate e capaci di proliferare solo in maniera limitata e da una piccola frazione di cellule caratterizzate da un grande potenziale proliferativo ed in grado di mantenere il tumore.

La prima documentazione che i tumori originano dalle cellule staminali risale al 1994 quando è stato visto che una sotto-popolazione di cellule leucemiche a fenotipo CD34+/CD38- era responsabile della insorgenza della leucemia nei topi (11).

Successivamente lo stesso principio è stato esteso ad altri tumori: popolazioni, biologicamente distinte e rare, di cellule “inizianti” il tumore sono state identificate oltre che in tumori del sistema ematopoietico (12) anche in alcuni tumori solidi, ad esempio il tumore alla mammella (3) e al cervello (13). Le cellule di questo tipo hanno la capacità di auto-rinnovarsi, la potenzialità di dare origine a una o più specie cellulari all'interno del tumore e l'abilità di guidare, in modo continuo, la proliferazione delle cellule tumorali stesse. Quindi queste cellule hanno proprietà strettamente simili a quelle delle cellule staminali normali, e di conseguenza sono state definite cellule staminali tumorali. Questa idea sostiene l'ipotesi che diversi tumori potrebbero essere organizzati in modo gerarchico a partire dalle cellule staminali tumorali, ad elevato potenziale replicativo, fino alle cellule tumorali più differenziate con un limitato potenziale replicativo.

Date queste caratteristiche, è possibile che le cellule staminali tumorali derivino dalle stesse cellule staminali normali in seguito ad una mutazione. Altre linee di ricerca sostengono invece che le cellule staminali tumorali potrebbero originare da cellule progenitrici mutate (14). Tali progenitori, detti anche “*transit-amplifying cells*”, possiedono una certa capacità replicativa ma, di solito, non sono in grado di auto-rinnovarsi. Quindi per diventare cellula staminale tumorale, un progenitore deve acquisire mutazioni che fanno sì che riacquisti la capacità di auto-rinnovamento (Figura 2).

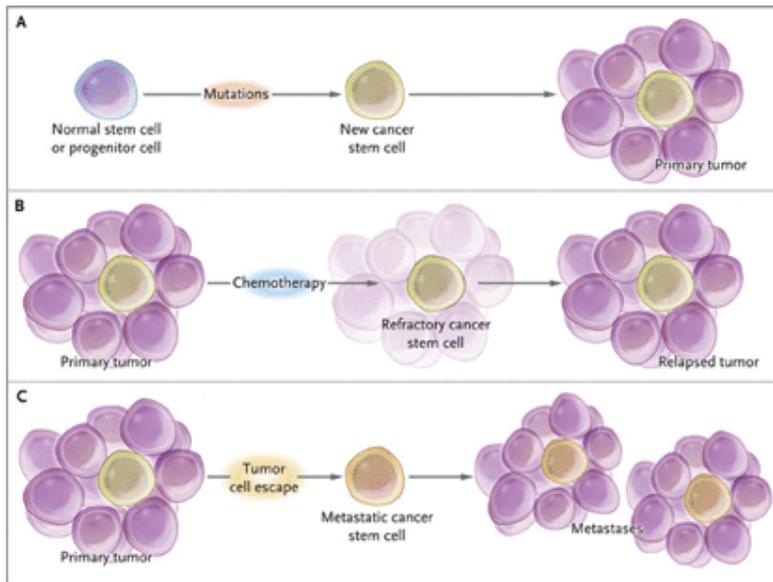


**Figura 2:** I tessuti normali derivano da una cellula staminale che cresce e si differenzia in progenitori e cellule mature. Le proprietà chiave delle cellule staminali normali sono l'abilità di auto-rinnovarsi (indicata dalle frecce curve), la multipotenza (indicata dalle cellule di colori diversi), e l'elevata capacità proliferativa. Le cellule staminali tumorali hanno origine da una mutazione in una cellula staminale normale o in una cellula progenitrice e di conseguenza crescono e si differenziano per formare tumori primari (la freccia tratteggiata indica che non sono ancora chiari i tipi specifici di progenitori coinvolti nella generazione di cellule staminali tumorali). Come le cellule staminali normali, anche le cellule staminali tumorali possono auto-rinnovarsi, dare origine a più tipi cellulari e proliferare ampiamente. (Jordan CT et al., 2006)

Sono tre le situazioni che si possono verificare e che riguardano le potenzialità delle cellule staminali tumorali: A) le cellule staminali tumorali, in seguito ad una mutazione di una cellula staminale normale, potrebbero dare origine ad altre cellule staminali tumorali e alla formazione di un tumore; B) potrebbero costituire una piccola "riserva" di cellule resistenti alla terapia e responsabili della ricaduta; C) potrebbero dare origine a metastasi in siti lontani rispetto al tumore primario (14) (Figura 3).

Queste possibilità hanno portato alla formulazione della *cancer stem cell (CSC) hypothesis*, secondo la quale a sostenere la crescita del tumore e a causare recidive, sarebbe una ristretta popolazione cellulare, costituita da cellule staminali con un elevato potenziale di auto-rinnovamento, ma che, in condizioni normali, resta quiescente e quindi in grado di resistere alla chemioterapia, che com'è noto, va a colpire le cellule in attiva proliferazione. Queste cellule si comportano quindi come le normali cellule

staminali non tumorali, tranne per il fatto di aver perso il normale equilibrio omeostatico tra auto-rinnovamento e differenziazione.



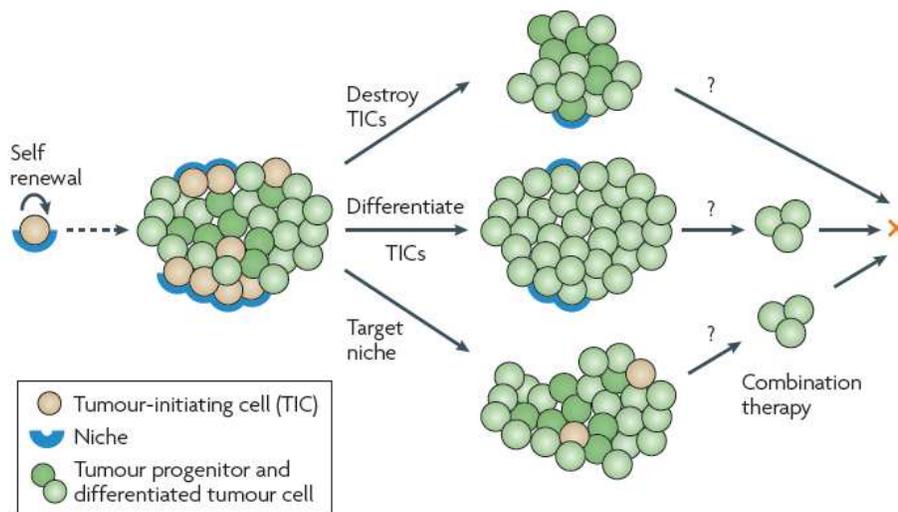
**Figura 3:** Per i tumori nei quali le cellule staminali tumorali sono coinvolte, ci sono tre diverse possibilità. A: la mutazione di una cellula staminale normale o di un progenitore può creare una cellula staminale tumorale, che genererà poi un tumore primario. B: durante il trattamento chemioterapico, la maggioranza delle cellule in un tumore primario può essere distrutta, ma se le cellule staminali tumorali non vengono eradicare, il tumore può riformarsi e causare una ricaduta. C: le cellule staminali tumorali possono allontanarsi dalla sede di origine del tumore e creare metastasi in sedi lontane. (Jordan CT et al., 2006)

L'ipotesi delle *cancer stem cells* è stata dimostrata per la prima volta da Bonnet e collaboratori che hanno dimostrato che solo una piccola sottopopolazione di cellule leucemiche CD34+/CD38-, fenotipicamente simili alle cellule staminali ematopoietiche, erano in grado di formare il tumore se inoculate in un topo NOD/SCID (*non-obese diabetic, severe combined immunodeficient*) (15). Cellule staminali tumorali sono state trovate anche in diversi tumori solidi, come nel tumore della mammella, dove sono state descritte cellule staminali con fenotipo CD44+/CD24-. Al-Hajj e collaboratori hanno distinto la componente tumorigenica da quella non tumorigenica sulla base dell'espressione di due marcatori di superficie: inoculando in un topo 100 cellule a fenotipo CD44+/CD24low/Lineage- si ha la formazione del tumore, dove invece molte più cellule con fenotipo diverso non erano in grado di formarlo (3). Le cellule staminali tumorali CD44+/CD24low/Lineage- possono essere definite tali in quanto non solo danno origine ad altre cellule con lo stesso fenotipo, ma possono differenziare in altri tipi cellulari non tumorali fenotipicamente diversi. In tumori cerebrali sono state isolate

cellule tumorali, positive per il marcatore di staminalità CD133, in grado di crescere *in vitro* come neurosfere, alle stesse condizioni che si utilizzano per coltivare le cellule staminali neuronali non-neoplastiche. Sono sufficienti 100 cellule di glioma positive per il CD133 inoculate nel cervello di un topo NOD/SCID perché si formi un tumore, quando invece nessun tumore si forma in seguito all'inoculo di almeno 100000 cellule negative per il CD133 (13,16,17). Anche nel MDB la piccola frazione di cellule CD133 positive è in grado di formare neurosfere multipotenti *in vitro* (13,18), ed è inoltre caratterizzato da livelli di espressione di Notch molto maggiori rispetto alle cellule CD133 negative (18,19). E' noto infatti dalla letteratura che alcune vie del segnale come Wnt, SonicHedgeog e Notch, che regolano la proliferazione e la sopravvivenza dei precursori neuronali non tumorali, sono spesso attivate in maniera aberrante nel tumore (19,20).

Per quanto appena detto, l'identificazione delle CSCs, in particolare in tumori solidi, è stata sicuramente facilitata dall'utilizzo di marcatori che identificano selettivamente le cellule staminali in campioni tumorali. I due marcatori principali utilizzati per isolare questa sottopopolazione di cellule, sono il CD133 e la *Side Population* (SP). Al CD133, per quanto riguarda i tumori cerebrali (13) e il tumore del colon (21), si sono aggiunti il CD44 e il CD24 per i tumori alla mammella (3); solo più recentemente si è iniziato a parlare della *Side Population* (SP) (2,22,23). E' molto interessante osservare che questi marcatori sono stati identificati anche su cellule staminali non tumorali, ad ulteriore riprova del fatto che ci sono notevoli similarità tra cellule staminali normali e staminali neoplastiche e che i tumori privi di una componente staminale sono quelli clinicamente meno aggressivi (18,27,24).

Quindi le cellule staminali tumorali hanno molte proprietà delle cellule staminali normali ed inoltre hanno la capacità di resistere ai farmaci e alle tossine attraverso l'espressione di trasportatori specifici (*ATP-binding cassette o ABC*) (25), hanno un'elevata capacità di riparazione del DNA grazie a proteine come MGMT (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) che è stata, ad esempio, trovata up-regolata in alcuni Glioblastomi e il cui mRNA è stato trovato maggiormente espresso nelle cellule staminali CD133+ (26), ed infine hanno una maggiore capacità di resistenza all'apoptosi. Le CSCs inoltre possono "mimare" altri tipi cellulari e possono adattarsi a cambiamenti micro ambientali. Un esempio di questa plasticità si nota a livello del microcircolo, dove le cellule tumorali esprimono geni associati alle cellule endoteliali, e conseguentemente danno il via alla neovascolarizzazione (6).



**Figura 4:** La Cancer stem cell hypothesis e le strategie terapeutiche che hanno come bersaglio le cellule tumorali. (Bin-Bing S. Zhou et al. 2009)

La *cancer stem cell hypothesis* sostiene che, all'interno del tumore, non tutte le cellule abbiano la stessa capacità di auto-rinnovarsi e di proliferare, ma solo una piccola frazione di cellule (*Tumour-initiating cells* o *TICs*) siano in grado di rinnovarsi in maniera illimitata, mentre il resto del tumore è composto da cellule progenitrici con limitata capacità proliferativa o da cellule già totalmente differenziate.

Sono diverse quindi le strategie terapeutiche che potrebbero essere applicate nel tentativo di colpire in modo specifico le TICs: 1) inibire le vie di trasduzione del segnale maggiormente coinvolte nel mantenimento delle TICs, in particolare le vie di Wnt (20,27,28), Hedgehog (20,29,30), Notch (19,20) e PI3K/Akt/mTOR (31,32) 2) sensibilizzare le cellule agli agenti chemioterapici utilizzando inibitori di quelle chinasi che controllano i punti chiave d'ingresso della cellula nel ciclo cellulare (33); 3) indurre la differenziazione delle TICs, utilizzando proteine quali BMPs (*Bone Morphogenetic proteins*) (34) o anticorpi monoclonali CD44-specifici (35,36). Un'altra alternativa potrebbe essere la terapia anti-angiogenica andando così a modificare la nicchia vascolare del tumore (20). Alcuni autori hanno dimostrato che le cellule staminali CD133+ di MDB si trovano più comunemente vicino a cellule endoteliali e a piccoli vasi, che creano la nicchia ideale per il mantenimento della componente staminale tumorale: la terapia anti-angiogenica priverebbe le cellule staminali tumorali dell'ambiente ideale per la loro sopravvivenza (18,31,37). Dal punto di vista terapeutico potrebbe essere vantaggioso combinare gli agenti che hanno come bersaglio le cellule

iniziati il tumore con agenti convenzionali ed i chemioterapici che hanno come bersaglio la nicchia del tumore.

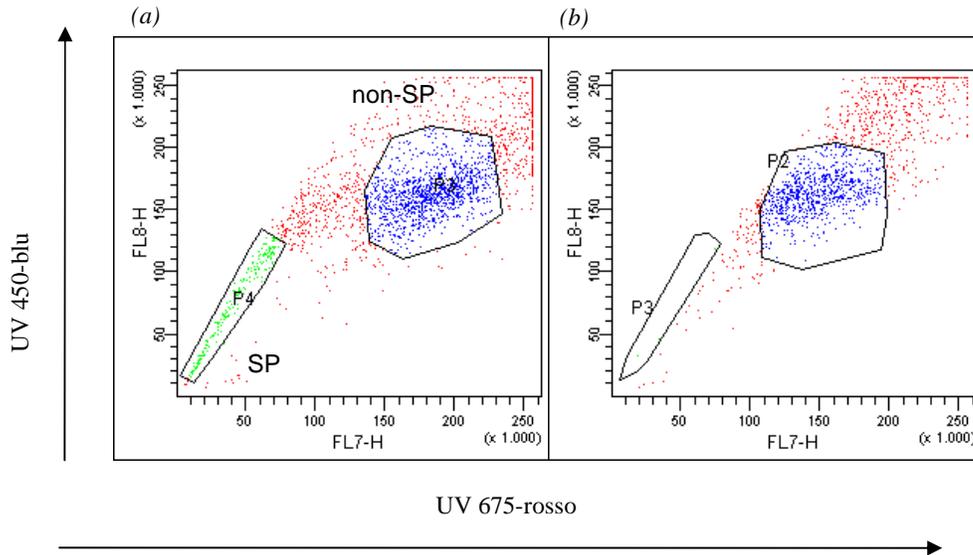
### ***La Side Population***

La *Side Population* (SP) è una piccola sottopopolazione cellulare costituita da cellule primarie indifferenziate, dotata di particolari caratteristiche e considerata da molti autori come una fonte arricchita di cellule staminali, particolarmente utile nelle situazioni in cui non sono noti marcatori molecolari. Essa è stata individuata e può essere isolata grazie alla capacità di estrusione di un colorante vitale, l'Hoechst 33342. Questo metodo fu messo a punto e utilizzato per la prima volta da Goodell e collaboratori (22) e si basa sulla caratteristica peculiare delle SP di colorarsi debolmente (rispetto alle altre cellule più mature) con il colorante vitale Hoechst 33342, in virtù di un meccanismo attivo di espulsione del colorante dall'interno della cellula. Il termine *side population*, o "popolazione laterale", deriva dalla loro localizzazione nel "*dot-plot*", risultato dell'analisi biparametrica blu-rosso (blu: 450nm e rosso: 675nm), in cui le SP compaiono in basso a sinistra. Brevemente, l'Hoechst 33342 si lega alle regioni ricche di adenina-timidina del solco minore del DNA, intercalandosi nella doppia elica. Leggendo un campione al citofluorimetro, contemporaneamente alle due lunghezze d'onda, dopo averlo colorato con l'Hoechst, le SP andranno a localizzarsi in basso a sinistra nel *plot* di analisi, dato che non avranno trattenuto il colorante al loro interno, e quindi risulteranno "negative" alla colorazione, mentre la controparte non-SP, trattenendo l'Hoechst all'interno, sarà più spostata verso l'alto e verso destra.

Per verificare che la popolazione individuata sia davvero la *side population*, viene aggiunto al campione analizzato un inibitore dei trasportatori della famiglia ABC, ad esempio il Verapamile, che bloccando l'efflusso del colorante Hoechst dalla cellula, fa "sparire" le SP dal *plot* di analisi.

I trasportatori trans-membrana utilizzati da queste cellule per l'estrusione sono soprattutto membri della superfamiglia ABC (*ATP-binding cassette*). Sono ATP-asi, che utilizzano l'energia metabolica fornita dall'ATP per creare il gradiente necessario al trasporto, che è di tipo attivo primario. Queste pompe sono implicate, tramite un meccanismo di trasporto attivo (2,23), nella protezione delle cellule da prodotti esogeni, in grado di penetrare la membrana plasmatica. Inoltre sembrano avere un ruolo determinante nell'inibire la maturazione e la differenziazione delle cellule staminali (2).

Ad esempio ABCG2 è over-espresso nelle cellule staminali ematopoietiche (38) e questa over-espressione impedisce la differenziazione (39). La aumentata espressione di questi trasportatori nelle SP potrebbe giustificare la loro singolare capacità di resistenza ai farmaci e la loro tolleranza alle condizioni di stress ipossico e far diventare così queste proteine dei *target* ideali per una terapia.



**Figura 5:** Esempio di analisi e di identificazione delle SP effettuata col sorter FACS Vantage SE (Becton Dickinson) a due lunghezze d'onda, UV-450/blu e UV-675/rosso. a) La regione verde rappresenta le SP, mentre la regione blu rappresenta le non-SP. b) controllo + Verapamile dove si nota che le SP spariscono

Da quando nel 1996, le SP sono state identificate per la prima volta (22), sono state trovate in molti tessuti con elevate capacità rigenerative, come la ghiandola mammaria (40), il polmone (41,42), il muscolo scheletrico (43), il cuore (44), il fegato (45,46) il cervello (47), la pelle (48,49).

Le SP dei tessuti normali si presentano come cellule immature, poco differenziate, in grado di dividersi in maniera asimmetrica e quiescenti, caratterizzate da una alta espressione di marcatori di staminalità e da bassi livelli di marcatori di differenziazione, da una elevata espressione di geni che fanno parte di alcune vie di trasduzione del segnale, come ad esempio la via di Wnt/ $\beta$ -catenina, che è stata dimostrata essere importante nella regolazione dell'auto-rinnovamento delle cellule staminali ematopoietiche (50) e di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare (23): tutte caratteristiche che definiscono una cellula staminale (12). E' stato inoltre osservato che le cellule SP sono più piccole rispetto alla controparte non-SP (51), in accordo con quanto afferma anche Paiva (52), e cioè che la piccola dimensione, *small cell size*, è una

caratteristica propria di staminalità. Le SP inoltre possiedono un reticolo endoplasmatico con pochi ribosomi, indice di una scarsa attività metabolica, altra caratteristica in comune con le cellule staminali (2,53).

Le cellule SP sono state identificate anche in una grande varietà di linee cellulari tumorali, in percentuali che vanno dallo 0,1% al 20% della popolazione cellulare totale (53,54). Le SP derivate dalle linee cellulari tumorali sono altamente tumorigeniche, meno differenziate rispetto alle non-SP ed in generale esprimono alti livelli di marcatori di staminalità e bassi livelli di marcatori di differenziazione (2,54). Per esempio, nella linea cellulare di glioma C6, solamente le cellule SP hanno la capacità di formare sia la popolazione SP che la non-SP, suggerendo che solo le cellule SP hanno la capacità di auto-rinnovarsi e ricostituire il fenotipo originale della linea cellulare; inoltre, solo le SP hanno l'abilità di crescere come neurosfere, una caratteristica propria delle cellule staminali neuronali, e di differenziare nelle diverse linee neuronali (23,55).

Le SP sono state trovate, inoltre, in diversi tumori, come il neuroblastoma (2,53), il melanoma (56), il retinoblastoma (57), la leucemia mieloide acuta (AML) (58), il glioma (55) ed il medulloblastoma (59,60). Sembra che la percentuale di SP presente in un tumore correli direttamente con il grado di tumorigenicità e di aggressività (61), anche se questa relazione deve essere confermata (23). Le SP ottenute dai tumori sono una popolazione eterogenea, arricchita in cellule staminali tumorali (2), e secondo l'ipotesi delle *cancer stem cells*, sono proprio le SP le cellule in grado di dare inizio al processo di tumorigenesi. Ho e collaboratori, utilizzando cellule tumorali polmonari, hanno dimostrato che la componente SP, separata dalla controparte non SP, è in grado di dare origine ad una popolazione mista formata sia dalla frazione SP che dalla frazione non-SP (divisione asimmetrica). Sempre Ho e collaboratori hanno dimostrato che, inoculando in un topo NOD/SCID 5000 cellule SP, si ha la formazione del tumore in 3/3 animali, quando invece sono necessarie almeno 100000 cellule non-SP perché si abbia la formazione di un tumore, solo in 1/4 casi e comunque di dimensioni inferiori, ad ulteriore riprova del fatto che sarebbe la controparte SP quella arricchita in cellule staminali e "iniziatrice" il tumore (12). Date queste caratteristiche, le SP potrebbero essere le responsabili dell'aggressività di alcuni tumori così come dello sviluppo della *drug resistance* (62) e potrebbero essere quindi il *target* ideale per una terapia efficace in grado di eradicare totalmente il tumore.

Diversi studi suggeriscono che le SP, come le cellule staminali tumorali, sono caratterizzate da una elevata resistenza alla chemioterapia. Dal momento che il fenotipo

SP è definito dall'attività dei trasportatori ABC, l'espressione di questi è stata analizzata in maniera dettagliata anche nelle SP "tumorali". Infatti attraverso i trasportatori ABC, come ABCG2 e MDR1, le cellule riescono ad estrarre xenobiotici, e vari antitumorali lipofili utilizzati nei protocolli classici di terapia, come la doxorubicina, o l'etoposide. La presenza e la over-espressione di questi trasportatori di membrana fa sì che molti farmaci non abbiano alcun effetto su queste cellule dato che vengono espulsi da esse, sostenendo in tal modo un processo di selezione della popolazione più resistente.

A conferma di quanto detto Hirshmann-Jax e collaboratori hanno dimostrato per la prima volta che le SP da neuroblastoma sono meno sensibili al mitoxantrone (53); Szotek e collaboratori invece che le SP da tumore dell'ovaio sono resistenti alla doxorubicina rispetto alle non SP (63); ed infine le SP da glioma e glioblastoma in seguito a trattamento con Temozolomide proliferano e in un certo senso vengono selezionate, a differenza delle non SP (64).

Un'altra caratteristica delle SP tumorali, così come delle CSCs, è la resistenza alla apoptosi. Le cellule staminali sono programmate per avere una lunga *lifespan* per mantenere il pool di progenitori dal quale deriveranno poi le cellule differenziate. Per questo motivo attivano dei meccanismi che le proteggano dalla senescenza e dallo stress. Questi meccanismi includono 1) l'attivazione di alcune vie, quali Shh, Wnt/ $\beta$  Catenina o BMI-1; 2) l'espressione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2; 3) un' aumentata capacità di riparazione dei danni al DNA; 4) la over-espressione dei trasportatori di membrana direttamente implicati nella estrusione di chemioterapici.

L'esatta natura della popolazione SP dovrà comunque essere ulteriormente chiarita, e rimane d'altra parte improbabile che sia costituita interamente da cellule in grado di iniziare il tumore; è molto più probabile invece che le cellule capaci di dare il via al tumore siano solo una piccola frazione all'interno della popolazione SP (23).

Comunque molti studi sostengono l'idea che le SP siano una popolazione arricchita in cellule staminali e che la percentuale di SP presente in un tumore correli direttamente con il grado di tumorigenicità e di aggressività (61) e che quindi potrebbero rivelarsi un modello ideale per la identificazione, l'isolamento e la caratterizzazione delle cellule staminali, in particolare in combinazione con altri marcatori cellulari. Qualche limitazione in questo approccio esiste. Infatti se da una parte l'utilizzo delle SP supera il problema della mancanza di altri marcatori cellulari che possano distinguere in maniera specifica la componente staminale all'interno di una popolazione cellulare, dall'altra le SP non rappresentano in modo completo l'intera coorte di cellule staminali e quindi

sono richiesti approcci ulteriori per una completa caratterizzazione di questa componente. Un secondo punto che deve essere valutato è il protocollo che viene applicato per identificare le SP, dato che numerosi sono i parametri da considerare nell'analisi, quali la concentrazione di cellule per campione, la quantità di Hoechst 33342 e di Verapamile da impiegare, la durata e la temperatura dell'incubazione e soprattutto il *set-up* dello strumento e la definizione del *gate* sulle cellule SP all'interno del *plot* di analisi (65). L'interpretazione del dato ottenuto risulta quindi di notevole complessità e deve essere fatto assolutamente in modo critico, in quanto potrebbe creare divergenze di risultati.

Sicuramente l'idea che l'evento chiave nella formazione di un tumore sia rappresentato dalla trasformazione in senso neoplastico di una cellula staminale normale è interessante e confermato da più dati sperimentali. Ad oggi i trattamenti che hanno come target specifico le cellule inizianti il tumore rappresentano una promessa e sono richiesti ulteriori approfondimenti nella definizione di uno o più marcatori specifici al fine di identificare una terapia più mirata e specifica. Date le loro caratteristiche, le SP potrebbero rappresentare un approccio alternativo, così come i trasportatori ABC responsabili del fenotipo SP e direttamente implicati nel fenomeno della *drug-resistance*. Quindi prendere come target della terapia le SP potrebbe essere una soluzione a questo fenomeno: ad esempio la combinazione di inibitori dei trasportatori ABC con farmaci anti tumorali è stata dimostrata migliorare il decorso clinico rispetto alla terapia convenzionale (25).

## **Bibliografia**

1. Pardal R, Clarke MF and Morrison SJ: Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer*, Vol. 3, 895-902, 2003
2. Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R and Balicki D: Sp analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res*, Vol. 312, 3701-3710, 2006
3. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 100, 3983-3988, 2003
4. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, Vol. 6859, 105-111, Nov 2001
5. E. Fuchs, J.A. Segre, Stem cells: a new lease on life, *Cell* 100 (2000) 143-155.

6. Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM and Postovit LM: Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer*, Vol. 4, 246-255, Apr 7 2007
7. G. Dontu, M. Al Hajj, W.M. Abdallah, M.F. Clarke, M.S. Wicha, Stem cells in normal breast development and breast cancer, *Cell Proliferation* 36 (Suppl. 1) (2003) 59–72.
8. J. Stingl, P. Eirew, I. Ricketson, M. Shackleton, F. Vaillant, D. Choi, H.I. Li, C.J. Eaves, Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells, *Nature* 439 (2006) 993–997.
9. Y. Ueno, H. Nagai, G. Watanabe, K. Ishikawa, K. Yoshikawa, Y. Koizumi, T. Kameda, T. Sugiyama, Transplantation of rat hepatic stem-like (HSL) cells with collagen matrices, *Hepatol. Res.* (2005).
10. C. Gregg, S. Weiss, Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells, *J. Neurosci.* 23 (2003) 11587–11601.
11. Tsvee Lapidot, Christian Sirard, Josef Vormoor, Barbara Murdoch, Trang Hoang, Julio Caceres-Cortes, Mark Minden, Bruce Paterson, Michael A. Caligiuri & John E. Dick A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648 (1994).
12. Ho MM, Ng AV, Lam S and Hung JY: Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*, Vol. 67, 4827-4833, May 2007
13. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD and Dirks PB: Identification of human brain tumour initiating cell. *Nature*, Vol. 432, 396-401, 2004
14. Jordan CT, Guzman ML and Noble M: Cancer stem cells. *N Engl J Med*, Vol. 355, 1253-1261, Sep 21 2006
15. Bonnet D and Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, Vol. 3, 73073-73077, 1997
16. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M and Kornblum HI: Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 100, 15178-15183, Dec 9 2003
17. Galli R, Binda E, Orfanelli U et al. : Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, Vol. 64, 7011-7021, 2004
18. Fan X and Eberhart CG: Medulloblastoma Stem Cells. *J Clin Oncol*, Vol. 26, 2821-2827, 2008
19. Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li YM and Eberhart CG: Notch Pathway Inhibition Depletes Stem-like Cells and Blocks Engraftment in Embryonal Brain Tumors. *Cancer Res*, Vol. 66, 7445-52, August 1, 2006
20. Bin-Bing S. Zhou, Haiying Zhang‡, Marc Damelin, Kenneth G. Geles Justin C. Grindley and Peter B. Dirks§ Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Oct;8(10):806-23. Review
21. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S and Dick JE: A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, Vol. 445, 106-110, 2007
22. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS and Mulligan RC: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med*, Vol. 183, 1797–1806, 1996

23. Wu C and Alman BA: Side Population cells in human cancers. *Cancer Letters*, Vol. 268, 1-9, 2008
24. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* Aug 2007;114(2):97-109.
25. Dean M, Foyo T and Bates S: Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews/Cancer* Vol 5, 275-284, Apr 2005
26. Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006;5:67
27. You, L. et al. An anti-Wnt-2 monoclonal antibody induces apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth. *Cancer Res.* 64, 5385-5389 (2004).
28. You, L. et al. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene* 23, 6170-6174 (2004).
29. Sanchez, P. et al. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 12561-12566 (2004)
30. Romer, J. T. et al. Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in *Ptc1<sup>+/-</sup> p53<sup>-/-</sup>* mice. *Cancer Cell* 6, 229-240 (2004).
31. Hambardzumyan, D. et al. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev.* 22, 436-448 (2008).
32. Zhou J, Wulfkuhle J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J, Margolick JB, Liotta LA, Petricoin E and Zhang Y: Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 104, 16158-16163, 2007
33. Bao, S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760 (2006).
34. Piccirillo, S. G. et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444, 761-765 (2006).
35. Jin, L., Hope, K. J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F. & Dick, J. E. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nature Med.* **12**, 1167-1174 (2006).
36. Marangoni, E. et al. CD44 targeting reduces tumour growth and prevents post-chemotherapy relapse of human breast cancers xenografts. *Br. J. Cancer* 100, 918-922 (2009).
37. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M et al.: A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, Vol. 11, 69-82, 2007
38. Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG and Cowan K: The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1 effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells). *Clin Cancer Res*, Vol. 8, 22-28, 2002
39. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H and Sorrentino BP: The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.*, Vol. 7, 1028-34, 2001
40. A.J. Alvi, H. Clayton, C. Joshi, T. Enver, A. Ashworth, M.M. Vivanco, T.C. Dale, M.J. Smalley, Functional and molecular characterisation of mammary side population cells, *Breast Cancer Res.* 5 (2003)

41. R. Summer, D.N. Kotton, X. Sun, B. Ma, K. Fitzsimmons, A. Fine, Side population cells and Bcrp1 expression in lung, *Am. J. Physiol., Lung Cell. Mol. Physiol.* 285 (2003) L97–L104.
42. M. Majka, M.A. Beutz, M. Hagen, A.A. Izzo, N. Voelkel and K.M. Helm, Identification of novel resident pulmonary stem cells: form and function of the lung side population, *Stem Cells* 23 (2005), pp. 1073–1081
43. A.P. Meeson, T.J. Hawke, S. Graham, N. Jiang, J. Elterman, K. Hutcheson, J.M. Dimaiio, T.D. Gallardo, D.J. Garry, Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells, *Stem Cells* 22 (2004)
44. C.M. Martin, A.P. Meeson, S.M. Robertson, T.J. Hawke, J.A. Richardson, S. Bates, S.C. Goetsch, T.D. Gallardo, D.J. Garry, Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart, *Dev. Biol.* 265 (2004) 262–275.
45. T. Ueda, M. Hsieh, J.F. Tisdale, Side population cells derived from adult human liver generate hepatocyte-like cells in vitro, *Dig. Dis. Sci.* 50 (2005) 1755–1763.
46. K. Shimano, M. Satake, A. Okaya, J. Kitanaka, N. Kitanaka, M. Takemura, M. Sakagami, N. Terada and T. Tsujimura, Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1, *Am. J. Pathol.* 163 (2003), pp. 3–9
47. M. Kim, C.M. Morshead, Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis, *J. Neurosci.* 23 (2003) 10703–10709.
48. Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Maltère P, Zobiri O, Gidrol X, Waksman G and Martin M.T: Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells*, Vol. 24, 965–974, 2006
49. Yano, Y. Ito, M. Fujimoto, T.S. Hamazaki, K. Tamaki and H. Okochi, Characterization and localization of side population cells in mouse skin, *Stem Cells* 23 (2005), pp. 834–841
50. Reya T. Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. *Recent Prog Horm Res.* 2003;58:283-95. Review.
51. Benchaouir R, Rameau P, Decraene C, Dreyfus P, Israeli D, Pietu G, Danos O and Garcia L: Evidence for a resident subset of cells with SP phenotype in the C2C12 myogenic line: a tool to explore muscle stem cell biology. *Exp Cell Res*, Vol. 294, 254–268, 2004
52. Paiva CS, Pflugfelder SC and Li DQ: Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells. *Stem Cells*, Vol. 24, 368–375, 2006
53. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA and Brenner MK: A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 101, 14228–14233, 2004
54. N. Haraguchi, T. Utsunomiya, H. Inoue, F. Tanaka, K. Mimori, G.F. Barnard, M. Mori, Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system, *Stem Cells* 24 (2006) 506–513.
55. Kondo T, Setoguchi T, Taga T: Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 101, 781–786, 2004
56. Grichnik JM, Burch JA, Schulteis RD, Shan S, Liu J, Darrow TL, Vervaert CE and Seigler HF: Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *J Invest Dermatol*, Vol 126, 142–153, 2006
57. G.M. Seigel, L.M. Campbell, M. Narayan, F. Gonzalez-Fernandez, Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma, *Mol. Vision* 11 (2005) 729–737.

58. G.G. Wulf, R.Y. Wang, I. Kuehnle, D. Weidner, F. Marini, M.K. Brenner, M. Andreeff, M.A. Goodell, A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia, *Blood* 98 (2001) 1166–1173.
59. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al.: Identification of a cancer stem cell in human brain tumours. *Cancer Res*, Vol. 63, 5821-5828,2003
60. Srivastava VK and Nalbantoglu J: Flow cytometric characterization of the DAOY medulloblastoma cell line for the cancer stem-like phenotype. *Cytometry*, Vol. 73, 940-948, Sep 2008
61. Moserle L, Indraccolo S, Ghisi M, Frasson C, Fortunato E, Canevari S, Miotti S, Tosello V, Zamarchi R, Corradin A, Minuzzo S, Rossi E, Basso G, Amadori A. The side population of ovarian cancer cells is a primary target of IFN-alpha antitumor effects. *Cancer Res*. 2008 Jul 15;68(14):5658-68.
62. Lidia Moserle, Margherita Ghisi, Alberto Amadori, Stefano Indraccolo Side population and cancer stem cells: Therapeutic implications *Cancer Letters*, In Press, Corrected Proof, Available online 11 June 2009
63. P.P. Szotek, R. Pieretti-Vanmarcke, P.T. Masiakos, D.M. Dinulescu, D. Connolly, R. Foster, D. Dombkowski, F. Preffer, D.T. Maclaughlin and P.K. Donahoe, Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and mullerian inhibiting substance responsiveness, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006), pp. 11154–11159.
64. C. Chua, N. Zaiden, K.H. Chong, S.J. See, M.C. Wong, B.T. Ang and C. Tang, Characterization of a side population of astrocytoma cells in response to temozolomide, *J. Neurosurg*. 109 (2008), pp. 856–866.
65. F. Montanaro, K. Liadaki, J. Schienda, A. Flint, E. Gussoni, L.M. Kunkel, Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters, *Exp. Cell Res*.298 (2004) 144–154.



## SCOPO DELLA TESI

Molti studi negli ultimi anni hanno dimostrato che alcune forme di tumore sono caratterizzate dalla presenza di cellule con specifiche proprietà *stem-like*, dette anche cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells/CSCs*). Le CSCs, considerate le cellule “inizianti” il tumore, hanno la capacità di auto-rinnovarsi, la potenzialità di dare origine a una o più specie cellulari all’interno del tumore e l’abilità di guidare, in modo continuo, la proliferazione delle cellule maligne. Molti studi hanno descritto il potenziale tumorigenico delle CSCs fino ad arrivare alla formulazione della *cancer stem cell (CSC) hypothesis*, secondo la quale a sostenere la crescita del tumore e a causare recidive, sarebbe una ristretta popolazione cellulare. Sono stati proposti due diversi approcci per caratterizzare le CSCs all’interno del tumore: il primo utilizza marcatori di superficie selettivamente espressi dalle CSCs, ma non dalla maggior parte delle cellule tumorali; il secondo approccio sfrutta alcune caratteristiche funzionali della cellula, come la peculiare capacità di colorarsi con coloranti specifici. In particolare, questo secondo metodo è utilizzato per l’identificazione, tramite citometria a flusso, della cosiddetta Side Population (SP), distinta sulla base della capacità di queste cellule di estrarre il colorante vitale Hoechst 33342. Le cellule SP rappresentano solo una piccola frazione di tutta la popolazione di cellule e, data la loro capacità di estrarre farmaci, rappresentano la frazione chemio-resistente all’interno del tumore. Inoltre le SP sembrano essere una fonte arricchita in cellule staminali.

In questa tesi abbiamo cercato di identificare e caratterizzare, dal punto di vista fenotipico e molecolare, la componente staminale, intesa sia come cellule staminali tumorali che come *Side Population*, in tipi diversi di tumori solidi.

Un primo studio ha valutato il ruolo e le caratteristiche delle cellule staminali tumorali, in particolare della sottopopolazione SP, in linee cellulari di Medulloblastoma (MDB) (Parte I). Una sempre maggiore esperienza nella tecnologia e nel setting del FACS (*Flow Activated Cell Sorter*) sorter ha permesso di estendere l’approccio sperimentale ad altri tipi di tumore e quindi di identificare le SP in cellule primarie di carcinoma ovarico e di indagare gli effetti che l’ IFN- $\alpha$  ha sulla componente tumorale. Questo è stato l’obiettivo di un secondo studio condotto nel Dipartimento di Oncologia e Scienze Chirurgiche di Padova in collaborazione con il nostro laboratorio (Parte II).

Nel corso dell'ultimo anno la nostra ricerca si è concentrata anche sulla caratterizzazione delle CSCs in linee cellulari e in colture primarie sia di medulloblastoma (MDB) (parte III) che di glioblastoma (GBM) (Parte IV).

L'ultima parte di questo lavoro si è focalizzata sullo studio, condotto principalmente nella Unità di Immunologia del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Laboratorio dello Istituto G.Gaslini di Genova, del ruolo che la IL-23 esercita sulle cellule di leucemia linfoblastica acuta-B (LLA-B). L'obiettivo è stato quello di studiare l'espressione e la funzione del recettore della IL-23 (IL23R) nelle cellule di leucemia acuta B pediatrica rispetto alla controparte normale e verificare se la IL-23 potesse esercitare una azione anti tumorale diretta sulle cellule di leucemia B e se sì quale fosse il meccanismo coinvolto (Parte V).

## Parte I

### **LY294002 inhibits cancer-stem cells clonogenicity in medulloblastoma cell lines**

Chiara Frasson<sup>1</sup>, Elena Fortunato<sup>1</sup>, Silvia Strazzacappa<sup>1</sup>, Erica Toffanin<sup>1</sup>, Francesca Pistollato<sup>1</sup>, Sara Abbadi<sup>1</sup>, Elena Rampazzo<sup>1</sup>, Luca Persano<sup>1</sup> and Giuseppe Basso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hemato-Oncology Laboratory, Department of Paediatrics, University of Padova, Italy

Ongoing study

Presentato come poster al ISSCR 7<sup>th</sup> Annual Meeting July 7-11 2009, Barcellona

---

Un primo studio, ha valutato il ruolo e le caratteristiche delle cellule staminali tumorali, in particolare della sottopopolazione SP, in linee cellulari di Medulloblastoma (MDB). Il MDB è uno dei più comuni tumori solidi pediatrici a livello del sistema nervoso centrale e dati recenti hanno dimostrato che anche il MDB sembra originare da una componente staminale. Abbiamo cercato di isolare la sottopopolazione con caratteristiche *stem-like* e di capire quale *pathway* fosse principalmente coinvolto nel mantenimento della componente staminale.

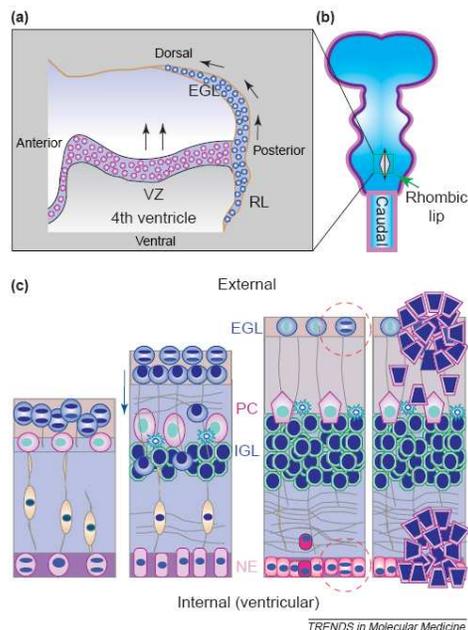


## Introduzione

Il medulloblastoma (MDB) è una neoplasia embrionale maligna ad elevata cellularità classificato come Tumore Primitivo Neuroectodermico (PNET), che origina nel cervelletto, la porzione del sistema nervoso centrale deputata principalmente al controllo dell'equilibrio e situata postero-inferiormente agli emisferi cerebrali.

Rappresenta il 15-25% dei tumori cerebrali dell'età pediatrica (1,2) ed è la più comune neoplasia solida nei bambini, mentre nell'adulto il MDB rappresenta l'1,7% di tutti i tumori primitivi a localizzazione cerebrale (3). Purtroppo questo tipo di tumore è particolarmente refrattario ai trattamenti chirurgici e farmacologici attuali. La sopravvivenza media per lunghi periodi non è favorevole: normalmente è di cinque anni nel 50-60% dei casi (2,4).

Come altri tumori cerebrali embrionali, anche il MDB sembra derivare da cellule staminali neurali o precursori cellulari della zona ventricolare e dello strato germinale esterno del cervelletto. Il cervelletto è costituito da due aree germinali distinte: la *ventricular zone* (VZ) che forma lo strato più profondo del cervelletto e lo strato germinale esterno (EGL) che ne definisce invece la parte esterna. In particolare il MDB origina dai progenitori delle *granule-cells*, localizzati nello strato germinale esterno (EGL) del cervelletto. Il picco della proliferazione e dell'espansione di queste cellule avviene in fase post-natale. In seguito si ha la differenziazione e la migrazione dei neuroni granulari per formare lo strato interno granulare (IGL) (5).

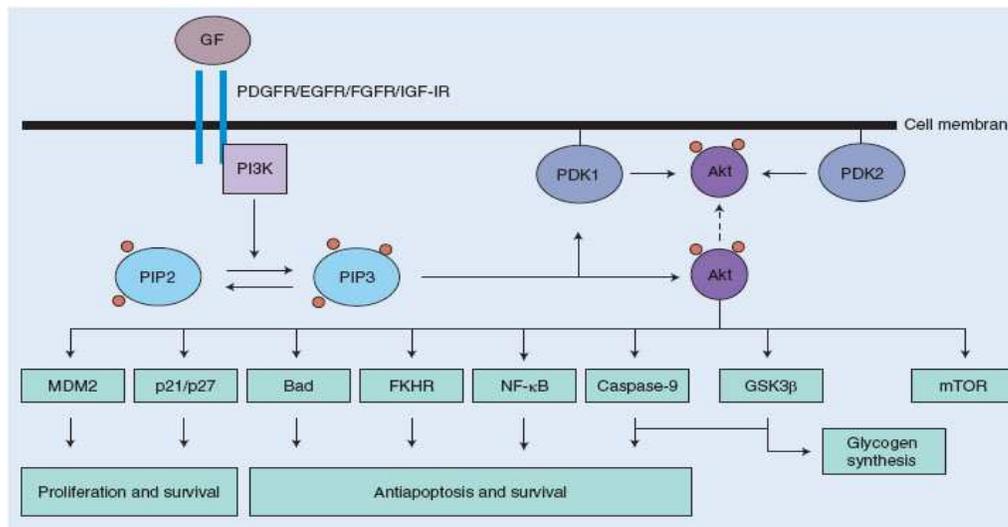


**Figura 1:** Rappresentazione schematica dello sviluppo cerebellare. (a) e (b) Sviluppo embrionale. I progenitori collocati nella zona ventricolare (VZ, zona germinale primaria) migrano radialmente per dare origine alle cellule di Purkinje. I progenitori collocati nel labbro rombico (RL) migrano dorsalmente per popolare lo strato granulare esterno (EGL, zona germinale secondaria). (c) Sviluppo postnatale. I progenitori collocati nell'EGL si espandono clonalmente, diventano post-mitotici, differenziano e migrano verso l'interno per generare lo strato granulare interno (IGL). Il sito d'origine del medulloblastoma (EGL e NE, neuroepitelio della zona ventricolare) è mostrato a destra. (Marino S. 2005).

Negli ultimi anni la ricerca ha fatto notevoli passi avanti nel tentativo di comprendere a fondo i meccanismi molecolari e le alterazioni genetiche coinvolti nella patogenesi di questo tumore. Nonostante ciò solo il 60% dei bambini affetti da questa patologia viene curato, e molti di essi soffrono per gli effetti indesiderati conseguenti alla lunga ed aggressiva terapia alla quale vengono sottoposti. (2,5). Ultimamente si è fatta strada l'ipotesi che ad iniziare la trasformazione maligna e a sostenere la crescita tumorale sia un piccolo clone di cellule rare che, all'interno dell'eterogeneità del tessuto tumorale, si distingue perché sembra possedere caratteristiche simili alle cellule staminali ed anche il MDB sembra contenere una sottopopolazione di questo tipo (6,7). Lee e collaboratori (8) hanno recentemente isolato cellule staminali CD133+ dal cervelletto in grado di auto-rinnovarsi e caratterizzate dalla capacità di differenziarsi in più tipi cellulari, sia *in vitro* che *in vivo*. Singh e collaboratori hanno dimostrato che, inoculando in topi NOD/SCID 100 cellule positive per il marcatore di staminalità CD133, si aveva la comparsa del tumore (9).

Sembra inoltre che alcune vie di trasduzione del segnale, che risultano essere iperattivate in seguito ad alterazioni genetiche, siano più importanti di altre nella cancerogenesi e vadano a sostenere la proliferazione cellulare incontrollata che si ha nel tumore. La via Sonic Hedgehog (Shh)-patched (Ptch) (10,11), la via di Wingless (Wnt) (12), la via di Notch sono alcune vie normalmente coinvolte nella regolazione dello sviluppo embrionale, nella proliferazione cellulare, nella differenziazione in diverse specie e nello stabilire il destino delle cellule progenitrici neuronali. Le mutazioni che riducono l'attività di Shh sono associate a severi difetti nel normale sviluppo del sistema nervoso centrale (10,11); più del 20% dei MDBs contengono mutazioni nella via di Wnt (13-15) e la perdita di Wnt1 o della  $\beta$ -catenina, effettore chiave di questa via, causa anomalie severe nello sviluppo del *midbrain* e del cervelletto (6); la via di Notch è attiva nelle cellule staminali neuronali e nei progenitori sia della VZ embrionale che dell'EGL post-natale e una sua deregolazione gioca un ruolo importante nella patogenesi del MDB (16). Un'altra importante via di trasduzione del segnale che controlla alcuni processi della cellula quali la crescita, la sopravvivenza e l'apoptosi e che sembra avere un ruolo chiave nella patogenesi del MDB è il *pathway* di PTEN/PI3K/Akt/mTOR. Recenti studi indicano che numerosi componenti di questa via sono soggetti ad amplificazioni, mutazioni, traslocazioni e riarrangiamenti con una frequenza maggiore rispetto ad altre vie (17) e che quindi la sua inibizione potrebbe avere un valore terapeutico importante nei pazienti colpiti dal MDB.

Alla luce delle considerazioni fatte, questo lavoro ha avuto lo scopo di studiare il ruolo del *pathway* di PTEN/PI3K/Akt/mTOR, che potrebbe essere direttamente coinvolto nella patogenesi molecolare del MDB. E' stata indagata inoltre la presenza nelle linee cellulari di MDB di quel *subset* di cellule indifferenziate che sembrerebbero essere le responsabili della tumorigenesi. L'identificazione e l'isolamento delle cellule staminali tumorali e la comprensione di quale via del segnale è alterata nel MDB, permetterebbe infatti di comprenderne le caratteristiche e le alterazioni specifiche, in modo da riuscire ad individuare nuovi *target* terapeutici e mettere a punto una strategia terapeutica più mirata, meno tossica per il paziente, e in grado di colpire quella popolazione che sembra essere responsabile, *in primis*, della tumorigenesi.



**Figura 2:** Rappresentazione della via di trasduzione del segnale PI3K/Akt/mTOR.. Il PI3K fosforila il PIP2 in PIP3, che a sua volta permette la traslocazione di Akt sulla membrana plasmatica dove è fosforilato e attivato da PDK1 e PDK2. Successivamente Akt fosforila e attiva diversi fattori a valle che promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. (18 Newton HB, 2004)

## Materiali e Metodi

Lo studio è stato condotto su linee cellulari di medulloblastoma (D425, D556, D341, D384, DAOY) e, quando possibile su linee primaria di medulloblastoma (HuTu33) e di Glioblastoma (HuTu13). La ricerca ha cercato di sviluppare due punti: 1) l'effetto dell' LY294002, inibitore specifico della *Phosphoinositide 3-kinases* (PI3K), chinasi a monte della via PI3K/Akt/mTOR sulle linee cellulari di medulloblastoma e la presenza nelle stesse linee delle cellule staminali.

L'effetto dell'LY294002, sulle linee cellulari di MDB è stato valutato, dopo 24h e 48h, tramite: 1) conta con il colorante vitale *Trypan blue* delle cellule non trattate (controlli) e le cellule trattate con 15 $\mu$ M LY294002; 2) valutazione della apoptosi tramite analisi della espressione della Annessina-V delle cellule trattate rispetto al controllo; 3) analisi del ciclo cellulare delle cellule trattate con LY294002 rispetto al controllo.

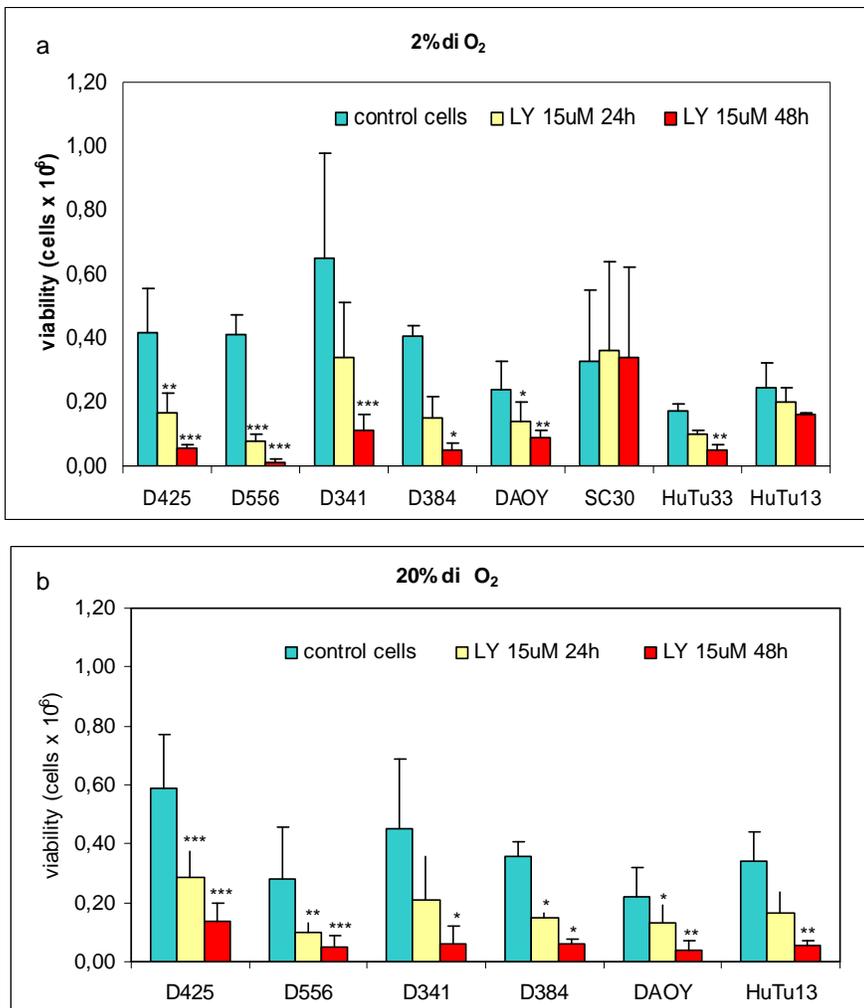
L'identificazione e l'isolamento delle cellule staminali è stata effettuata grazie all'analisi della *Side Population* (SP) tramite colorazione con il colorante vitale Hoechst 33342 (19). Sulla base di questa colorazione le SP sono state identificate, sortate e successivamente trattate con LY294002 nel tentativo di stimare l'effetto dell'inibitore su ogni singola popolazione. Inoltre, tramite test di clonogenicità, è stata studiata l'abilità di formare colonie "*in vitro*" da parte delle cellule SP e non SP, quale indice di potenziale tumorigenicità *in vivo*. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in condizioni di normossia (20% O<sub>2</sub>) e di ipossia (2% O<sub>2</sub>), nel tentativo di valutare se una bassa tensione di O<sub>2</sub> potesse essere un fattore discriminante nella risposta ai trattamenti (20,21,22). Le cellule sono state mantenute a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. L'ipossia ( $\leq$ 2% O<sub>2</sub>) è regolata grazie ad un'opportuna camera ipossica nella quale i valori di O<sub>2</sub> (2%), CO<sub>2</sub> (5%) e N<sub>2</sub> (93%) sono strettamente mantenuti costanti e controllati grazie ad un sistema di sensori computer-controllato (Biospherix, Ltd., Syracuse, NY).

## Risultati

### **LY294002 ha un effetto antiproliferativo sulle linee cellulari di MDB ed induce apoptosi preceduta da un blocco in fase G<sub>1</sub> del ciclo cellulare**

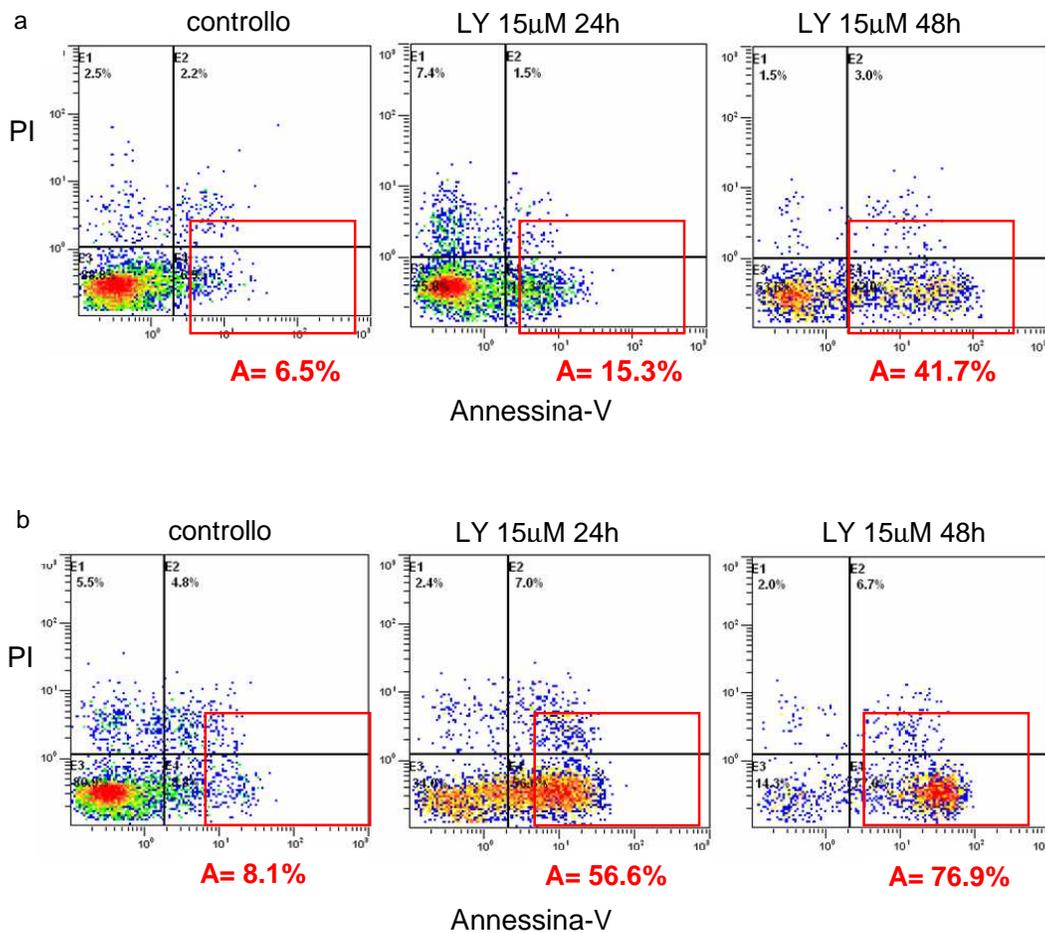
Il trattamento con LY294002 ha un effetto antiproliferativo in tutte le linee cellulari di MDB studiate, sia al 2% che al 20% di O<sub>2</sub>, in modo dose- e tempo- dipendente.

Il trattamento con LY294002 causa circa il 50% di morte cellulare dopo 24h, che raggiunge un 71% di mortalità dopo 48h di trattamento (Figura 3).

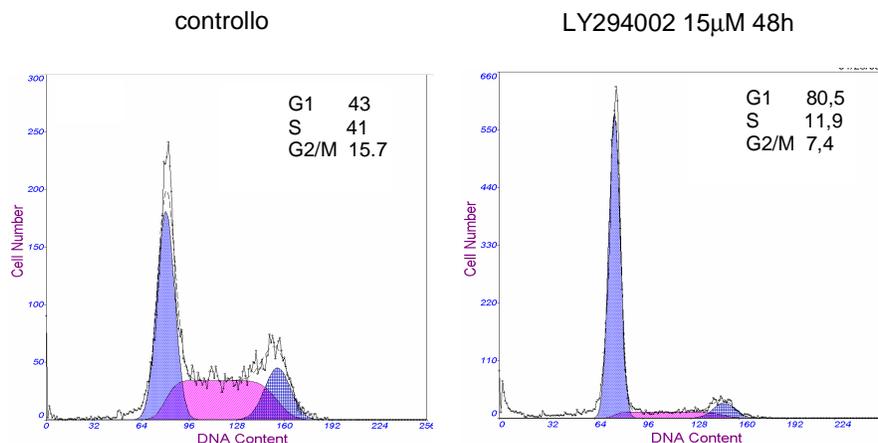


**Figura 3:** conta media  $\times 10^6$  di almeno tre esperimenti per ciascuna linea cellulare di MDB ed effetto del LY294002 alle 24h e 48h, al 2% di O<sub>2</sub> (a) e al 20% di O<sub>2</sub> (b). Controllo (colonna azzurra), LY 15µM 24h (colonna gialla) e LY 15µM 48h (colonna rossa) \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Per valutare se, oltre ad un effetto antiproliferativo, il trattamento con LY294002 facesse morire le cellule per apoptosi è stata valutata l'espressione della Annessina-V, una proteina specifica per la fosfatidilserina, che normalmente è localizzata all'interno della membrana citoplasmatica ma che, in caso di apoptosi, viene esposta all'esterno. L'analisi della espressione della Annessina-V ci ha permesso di verificare che in tutte le linee di MDB trattate con l'inibitore viene indotta apoptosi (Figura 4) preceduta da un blocco in fase G<sub>1</sub> del ciclo cellulare (Figura 5).



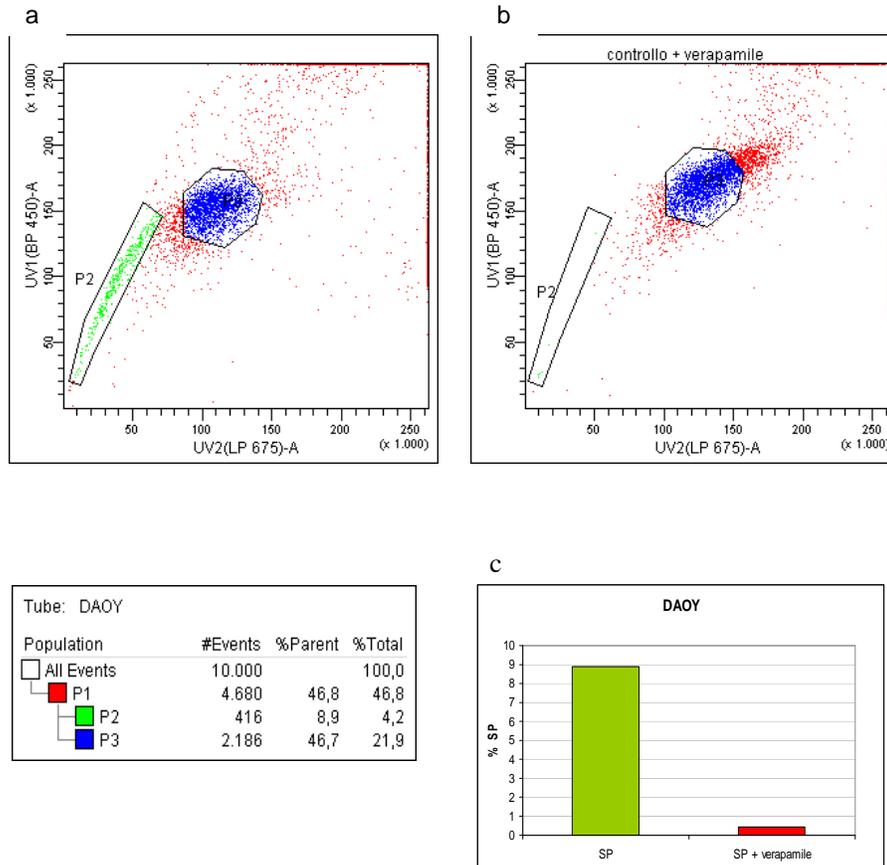
**Figura 4:** DAOY 2%  $O_2$  (a) e DAOY 20%  $O_2$  (b). Grafico rappresentativo della espressione della Annessina-V in cellule non trattate con LY294002 (controllo) ed in cellule trattate con LY294002 alle 24h e alle 48h. Sull'asse delle ascisse è riportata l'espressione della Annessina-V, sull'asse delle ordinate l'espressione del PI.



**Figura 5:** Grafico del ciclo cellulare delle DAOY al 20%  $O_2$ , rappresentative anche delle altre linee cellulari: (a): controllo, (b): LY294002 48h.

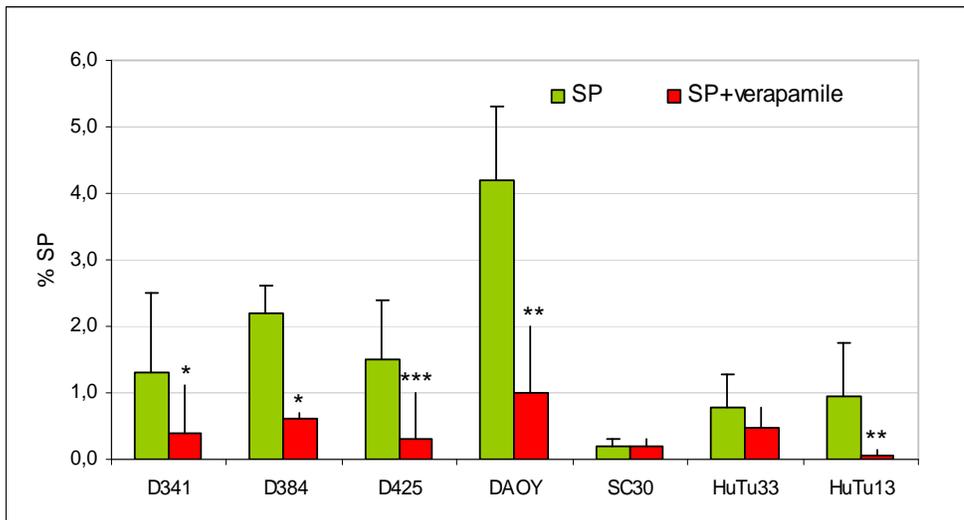
**E' stata identificata nelle linee cellulari di medulloblastoma una popolazione distinta in base alla colorazione con Hoechst, detta *side population* (SP), arricchita in cellule staminali.**

Per identificare ed eventualmente isolare le SP è stato utilizzato il metodo messo a punto da Goodell e collaboratori (19), che si basa sulla caratteristica peculiare di queste cellule di colorarsi debolmente, rispetto alle cellule più mature o non SP, con il colorante vitale Hoechst 33342, grazie ad un meccanismo di esclusione attiva del colorante dall'interno delle cellule. Il termine SP deriva dalla loro localizzazione in basso a sinistra nel "dot-plot", risultato dell'analisi biparametrica blu-rosso. Una parte delle cellule è stata incubata anche con il Verapamile, un inibitore delle pompe *ATP binding cassette* (ABC), che blocca l'efflusso di Hoechst dalla cellula e quindi fa "sparire" le SP dal *plot* di analisi (Figura 6).



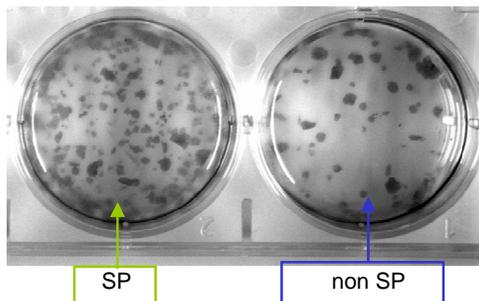
**Figura 6:** Esempio di analisi. Dot-plot che mostra le regioni corrispondenti alle cellule SP e non-SP (a) ed SP + Verapamile (b) delle DA0Y (rappresentative anche per tutte le altre linee). Il nostro controllo è rappresentato dalla provetta in cui è stato aggiunto il Verapamile, un calcio-antagonista, che, bloccando i canali attraverso cui le cellule estrudono l'Hoechst, fa sì che le SP spariscono dal plot. (c). Rappresentazione grafica, riferita al dot-plot, della percentuale di SP ed SP+ Verapamile nella linea DA0Y in un esperimento preso come esempio.

Nelle linee cellulari di MDB analizzate è stata identificata una popolazione SP, con un valore percentuale medio di  $2.4 \pm 1.1\%$ , ed un *range* che va dal 4.2% delle DAOY all'1.3% delle D341. Le percentuali di cellule SP nelle diverse linee cellulari analizzate presentano una certa variabilità. In tutti i casi, comunque, l'incubazione con il Verapamile fa "sparire" le SP dal *plot* di analisi, spesso in maniera significativa, confermando la loro identità (Figura 7).



**Figura 7:** Percentuale, data dalla media di più letture, delle SP (colonne verdi) e delle SP+Verapamil (colonne rosse) nelle linee cellulari di MDB; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

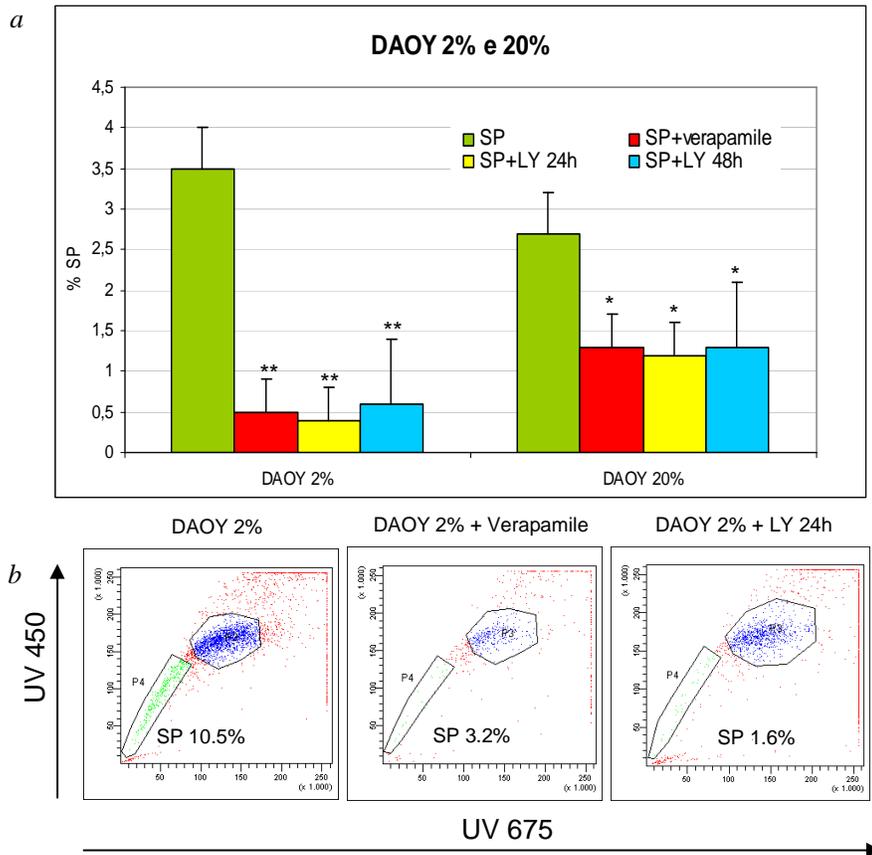
Tramite il test di clonogenicità è stata valutata la capacità delle cellule SP e della controparte non-SP di formare colonie *in vitro*, indice della potenziale tumorigenicità *in vivo*.



**Figura 8 :** Test di clonogenicità. L'immagine mostra la differenza nella capacità di formare colonie tra le cellule SP e le non-SP.

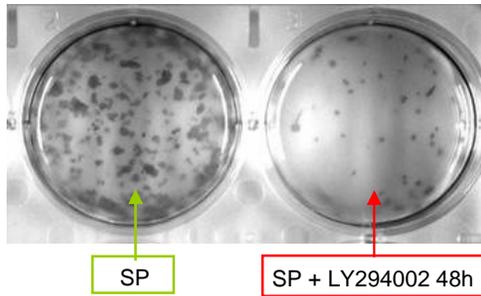
Come si può notare dalla figura 8, il numero di colonie che le SP sono in grado di formare è molto più elevato rispetto alle non-SP, a parità di cellule piastrate, ad indicare che le cellule SP risultano essere più clonogeniche *in vitro* rispetto alle non-SP.

L'effetto del trattamento con LY294002 sembra essere specifico nei confronti della popolazione SP: infatti le SP diminuiscono sia dopo 24h che dopo 48h di trattamento, con un effetto pari o maggiore rispetto a quello riscontrato nella condizione con il Verapamile, che rappresenta il controllo interno dell'esperimento (Figura 9).



**Figura 9:** Variazioni della percentuale di SP in seguito al trattamento con LY294002 alle 24h (colonne gialle) e alle 48h (colonne azzurre) rispetto al controllo (colonne verdi) e al controllo+Verapamile (colonne rosse), nella linea cellulare DAOY, sia al 2% che al 20% di O<sub>2</sub>, rappresentativa anche delle altre linee (a). Dot-plot ottenuti dall'analisi delle DAOY al 2% di O<sub>2</sub> dove si può notare la scomparsa delle SP quando viene aggiunto il Verapamile (in centro), e LY294002 (a destra), rispetto al controllo (a sinistra) (b); \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

La diminuzione delle SP in seguito a trattamento è stata riscontrata in quasi tutte le linee cellulari e in misura diversa. Non è stata vista una differenza significativa tra le cellule in ipossia e le cellule in normossia né per quanto riguarda la percentuale di SP né per quanto riguarda la risposta al trattamento. Il trattamento con LY294002 determina oltre ad una diminuzione della percentuale delle SP anche una riduzione della loro capacità clonogenica *in vitro* (Figura 10).



**Figura 10 :** Test di clonogenicità. L'immagine mostra la differenza nella capacità di formare colonie tra le cellule SP (controllo) e le SP trattate con LY294002

## Conclusioni

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli passi avanti nel tentativo di capire la patogenesi e le alterazioni genetiche che portano alla formazione del MDB, ma nonostante i progressi raggiunti sia nella chirurgia che nella chemioterapia, le cure sono ancora difficili. La maggiore difficoltà e limitazione è rappresentata dalla mancanza di specificità delle terapie convenzionali (4). Sebbene infatti molti MDBs presentino identiche caratteristiche istologiche, rispondono in modo diverso alla chirurgia, alle radiazioni e alla chemioterapia. Molte evidenze portano a pensare che la risposta al trattamento dipenda dalla biologia intrinseca del tumore, e che farmaci il cui bersaglio siano le vie di trasduzione del segnale, potrebbero fornire una valida alternativa agli approcci di trattamento convenzionali, diminuendo da un lato la tossicità legata alla terapia (2,4,23), e dall'altro aprendo le porte ad un trattamento paziente-specifico.

Di recente è stato ipotizzato che il MDB, oltre a derivare dalle cellule staminali neurali e dai precursori neuronali, contenga al suo interno una sottopopolazione cellulare con caratteristiche simili alle cellule staminali (24). Dalla letteratura si conosce già abbastanza bene il ruolo delle CSCs nello sviluppo del tumore (25,26) ed inoltre negli ultimi anni si è parlato molto di *side population* (SP), una piccola sottopopolazione cellulare costituita da cellule primarie indifferenziate, dotata di particolari caratteristiche e considerata da molti autori come una fonte arricchita di cellule staminali (27). E' noto poi che alcune vie del segnale che regolano la proliferazione e la sopravvivenza dei precursori neuronali non tumorali, sono spesso attivate in maniera aberrante nel tumore (19,20). In particolare la via di PTEN/PI3K/Akt/mTOR sembra essere importante nel processo di tumorigenesi e sono state descritte mutazioni di una o più chinasi in punti diversi della via (28-33).

Questo lavoro ha avuto lo scopo di valutare, tramite l'uso di un inibitore specifico della PI3K, LY294002, il ruolo della via PTEN/PI3K/Akt/mTOR e di valutare la presenza della componente staminale nelle linee cellulari di MDB. L'inibizione della PI3K, nelle linee cellulari di MDB, ha determinato una diminuzione della proliferazione cellulare, un blocco del ciclo cellulare in fase G<sub>1</sub> preceduto dalla morte delle cellule per apoptosi. Inoltre le cellule trattate con LY294002 diminuiscono la loro capacità di formare colonie *in vitro*, indice della loro potenziale tumorigenicità *in vivo*.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti a due diverse tensioni di O<sub>2</sub>, partendo dal fatto che è stato dimostrato che l'ipossia è un fattore indispensabile nella regolazione della proliferazione e della differenziazione delle cellule staminali e dei progenitori durante lo sviluppo cerebrale (34) e che queste condizioni costituiscono la nicchia ideale per la crescita dei tumori cerebrali, in quanto favoriscono il mantenimento della componente più staminale e resistente (35). Gli effetti del trattamento con LY294002 sono risultati essere però indipendenti dalla tensione di O<sub>2</sub>. L'unica differenza che si è potuta notare è stata che le cellule al 2% di O<sub>2</sub> sembrano avere un metabolismo molto più elevato: infatti il terreno risultava essere molto più giallo/virato (quindi catabolicamente acidificato) rispetto a quello delle cellule mantenute al 20% di O<sub>2</sub>. Questo fenomeno potrebbe anche essere spiegato dal fatto che in ipossia HIF-1 $\alpha$  viene attivato e non degradato, e andando ad agire su fattori a valle, regola il metabolismo delle cellule, in particolare favorendo il passaggio dal ciclo degli acidi tricarbossilici alla glicolisi, la via metabolica ossigeno-indipendente, utilizzata dalle cellule in ipossia come fonte primaria di energia (36). Inoltre l'inibizione della PI3K da parte dell'LY294002, e quindi di HIF-1 $\alpha$ , uno degli effettori a valle della via, potrebbe rivelarsi utile anche per bloccare l'angiogenesi indispensabile per la crescita del tumore e per il processo di metastasi e quindi alterare quei meccanismi che sostengono l'invasività del tumore (37).

Una volta valutato quale fosse l'effetto del LY294002 sulle linee di MDB, abbiamo cercato di identificare la componente staminale. Abbiamo sfruttato il protocollo messo a punto da Goodell e collaboratori, che sfrutta una caratteristica peculiare di questa cellule e cioè la capacità di estrarre il colorante vitale Hoechst33342, grazie alla presenza di trasportatori specifici trans-membrana.

Nelle linee cellulari di MDB ed in alcune linee primarie sono state identificate le SP, in percentuali diverse a seconda della linea analizzata, con valori comunque paragonabili a quelli trovati in letteratura (38). La diminuzione della percentuale delle SP nei campioni ai quali veniva aggiunto il Verapamil è significativa e ci ha permesso di confermare la

loro identità ed il coinvolgimento delle pompe ABC nell'estrusione del colorante. Il test di clonogenicità ha messo in evidenza una capacità più spiccata delle SP di formare colonie, rispetto alla controparte non-SP a conferma della ipotesi che le SP sono potenzialmente più tumorigeniche rispetto alla controparte non-SP. Un risultato importante di questo lavoro è che *in vitro* l'LY294002 diminuisce significativamente la percentuale delle cellule SP in tutti i campioni analizzati rispetto al controllo non trattato. Questi primi risultati sembrano sottolineare l'importanza della via di PI3K/Akt/mTOR nel mantenimento della componente staminale e potenzialmente più resistente alla chemioterapia. L'inibizione di questa via con un inibitore specifico riduce significativamente sia la proliferazione delle cellule trattate rispetto al controllo che la loro tumorigenicità *in vitro*. Quindi si può pensare che la via PI3K/Akt/mTOR sia importante per la sopravvivenza della componente SP e che la ridotta tumorigenicità *in vitro*, osservata nelle cellule SP trattate con LY294002, sia forse dovuta ad una diminuzione della componente staminale all'interno della frazione SP. E' necessario comunque sottolineare che, in generale, se da un parte le SP sembrano rappresentare una popolazione arricchita in cellule staminali (39), dall'altra questa peculiarità rimane ancora controversa (40).

## **Bibliografia**

1. CBTRUS, Central Brain Tumor Registry of the United States (2004–2005) *Primary Brain Tumors in the United States, Statistical Report, 1997–2001, Years Data Collected*. Chicago: Central Brain Tumor Registry of the United States.
2. Gilbertson RJ: Medulloblastoma: signaling a change in treatment. *Lancet Oncol*, Vol. 5, 209-218, Apr 2007
3. AW Chan, NJ Tarbell and PM Black *et al.*, Adult medulloblastoma: prognostic factors and patterns of relapse, *Neurosurgery* 47 (2000), pp. 623–631.
4. Rossi A, Cracciolo V, Russo G, Krzysztof R and Giordano A: Medulloblastoma: From Molecular Pathology to Therapy. *Clin Cancer Res*, Vol. 14, 971-976, Feb 15 2008
5. Marino S: Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med*, Vol. 11, 17-22, Jan 2005
6. Fan X and Eberhart CG: Medulloblastoma Stem Cells. *J Clin Oncol*, Vol. 26, 2821-2827, 2008
7. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M *et al.*: Identification of a cancer stem cell in human brain tumours. *Cancer Res*, Vol. 63, 5821-5828, 2003
8. Lee A, Kessler JD, Read TA, *et al.*: Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci* 8:723-729, 2005

9. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD and Dirks PB: Identification of human brain tumour initiating cell. *Nature*, Vol. 432, 396-401, 2004
10. MD Taylor, L Liu and C Raffel *et al.*, Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma, *Nat Genet* 31 (2002), pp. 306-310.
11. Sarkar C, Deb P. and Sharma MC: Medulloblastoma: new directions in risk stratification. *Neurol India*, Vol. 54, 16-23, Mar 2006
12. Parda R, Clarke MF and Morrison SJ: Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer*, Vol. 3, 895-902, 2003
13. MA Grotzer, MD Hogarty and AJ Janss *et al.*, MYC messenger RNA expression predicts survival outcome in childhood primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma, *Clin Cancer Res* 7 (2001), pp. 2425-2433
14. CG Eberhart, J Kratz and Y Wang *et al.*, Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: c-myc, N-myc, TrkC, and anaplasia, *J Neuropathol Exp Neurol* 63 (2004), pp. 441-449.
15. Crawford JR, MacDonald TJ and Packer RJ: Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol*, Vol. 6, 1073-1085, Dec 2007
16. X Fan, I Mikolaenko and I Elhassan *et al.*, Notch1 and Notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth, *Cancer Res* 64 (2004), pp. 7787-7793.
17. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y and Mills GB: Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature*, Vol. 4, 988-1004, Dec 2005
18. Newton HB: Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. *Expert rev Anticancer ther*, Vol. 2, 105-128, 2004
19. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS and Mulligan RC: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med*, Vol. 183, 1797-1806, 1996
20. Blazek ER, Foutch JL and Maki G: Doxy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J radiact oncol Biol Phys*, Vol. 67, 1-5, 2007
21. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U and Bondesson M: Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*, Vol. 9, 617-628, 2005
22. Pistollato F, Chen HL, Schwartz PH, Basso G and Panchision DM: Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci*, Vol. 35, 424-435, Apr 12 2007
23. Raffel C: Medulloblastoma: molecular genetics and animal models. *Neoplasia*, Vol. 6, 310-322, 2004
24. Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM and Postovit LM: Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer*, Vol. 4, 246-255, Apr 7 2007
25. Bonnet D and Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, Vol. 3, 73073-73077, 1997
26. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 100, 3983-3988, 2003
27. Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R and Balicki D: Sp analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res*, Vol. 312, 3701-3710, 2006

28. Mizoguchi M, Nutt CL, Mohapatra G and Louis DN: genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol*, Vol. 14, 372-377, 2004
29. Broderik DK et al.: Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res*, Vol. 64, 5048-5050, 2004
30. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y and Mills GB: Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature*, Vol. 4, 988-1004, Dec 2005
31. Campbell IG et al.: Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res*, Vol. 64, 7678-7681, 2004
32. Samuels Y et al.: High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancer. *Science*, Vol. 304, 554, 2004
33. Osaki M, Oshimura M and Ito H: PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, Vol. 6, 667-676, Nov 2004
34. Jogi A, Ora I, Nilsson H, Lindeheim A, Makino Y, Poellinger L, Axelson H, Pahlman S: Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:7021-7026
35. Hamanaka Y, Mukai M, Shimamura M, Kitagawa T, Nishida T, Isohashi F, Ito T, Nishizawa Y, Tatsuta M, Matsuda H and Inoue M: Suppression of PI3K/mTOR pathway rescues LLC cells from cell death induced by hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 330, 318-326, 2005
36. Harris AL: Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nature*, Vol. 2, 38-47, Jan 2002
37. Jiang BH and Liu LZ: PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 20, 1-9, 2007
38. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 2005;65:6207-19.
39. Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 2006;24:3-12.
40. Triel C, Vestergaard ME, Bolund L, Jensen TG, Jensen UB. Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp Cell Res* 2004;295:79-90.

## Parte II

### **The Side Population of Ovarian Cancer Cells Is a Primary Target of IFN- $\alpha$ Antitumor Effects**

Lidia Moserle,<sup>1</sup> Stefano Indraccolo,<sup>4</sup> Margherita Ghisi,<sup>1</sup> Chiara Frasson,<sup>2</sup> Elena Fortunato,<sup>2</sup> Silvana Canevari,<sup>5</sup> Silvia Miotti,<sup>5</sup> Valeria Tosello,<sup>1</sup> Rita Zamarchi,<sup>4</sup> Alberto Corradin,<sup>3</sup> Sonia Minuzzo,<sup>1</sup> Elisabetta Rossi,<sup>1</sup> Giuseppe Basso,<sup>2</sup> and Alberto Amadori<sup>1,4</sup>

Departments of <sup>1</sup>Oncology and Surgical Sciences, <sup>2</sup>Pediatrics, and <sup>3</sup>Information Engineering, University of Padova; <sup>4</sup>Istituto Oncologico Veneto, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Padua, Italy; and <sup>5</sup>Department of Experimental Oncology, Unit of Molecular Therapies, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy

Cancer Research 2008; 68 (14): 5658-68.

---

Una sempre maggiore esperienza acquista in questi anni nella tecnologia e nel *setting* del FACS sorter ha permesso di estendere l'approccio sperimentale di identificazione ed isolamento della *Side Population* ad altri tipi di tumore e quindi di identificare le SP sia in cellule primarie di carcinoma ovarico e di indagare gli effetti che l' IFN- $\alpha$  ha sulle cellule tumorali. Questo è stato l'obiettivo di un secondo studio condotto nel Dipartimento di Oncologia e Scienze Chirurgiche di Padova in collaborazione con il nostro laboratorio.



## Introduzione

Negli ultimi anni si è fatta strada l'ipotesi che l'insorgere del tumore potesse essere sostenuto da una sottopopolazione di cellule con caratteristiche di cellule staminali, che possono essere identificate sia per la presenza di marcatori di superficie che da particolari tecniche di colorazione, quali l'Hoechst 33342 (1-3). Questo metodo si basa sulla identificazione al citometro a flusso della cosiddetta *Side Population* (SP), la cui caratteristica peculiare è quella di essere meno "colorata" (rispetto alle cellule più mature o non SP), per un meccanismo di trasporto attivo che permette loro di estrudere il colorante dalle cellule, attraverso pompe specifiche, quali MDR1 e ABCG2 (4,5). Le SP sono state identificate in diversi tipi di tumori, quali la leucemia, il tumore alla mammella, alla prostata, nel glioma e nel medulloblastoma. (6-12), così come in tessuti normali con elevata capacità proliferativa quali il midollo osseo, il muscolo scheletrico, il fegato, la ghiandola mammaria (13,14). Le SP sembrano rappresentare una popolazione arricchita in cellule staminali (14), sebbene questa peculiarità sia ancora controversa (15).

Una delle caratteristiche delle cellule staminali tumorali è la loro capacità di resistenza ai chemioterapici (16) e alla radioterapia (17), proprietà che è a favore della ipotesi che queste cellule possano essere le responsabili della ricaduta e della progressione della malattia. A loro volta le SP hanno un aumentato livello di espressione di alcuni trasportatori di membrana, quali ABCG2 e MDR1, diretti responsabili della estrusione degli agenti chemioterapici (8) e quindi direttamente implicati nella *drug resistance*. Di conseguenza, l'identificazione di farmaci in grado di avere un effetto terapeutico sulle cellule staminali tumorali e/o sulle SP, potrebbe rappresentare un punto chiave nel controllo a lungo termine del tumore.

L'IFN- $\alpha$  è una citochina con effetti pleiotropici che si pensa possano contribuire alla sua attività antitumorale, inclusa l'inibizione della proliferazione, l'induzione della differenziazione o della apoptosi, la stimolazione del sistema immunitario e l'attività angiostatica (18-20). L'IFN- $\alpha$  è usata per trattare pazienti con tumori solidi, incluso il carcinoma ovarico epiteliale, con risultati però, poco soddisfacenti. Risposte migliori si sono avute occasionalmente (21-23), portando ad una serie di *clinical trials* su larga scala. Sebbene siano conosciuti gli effetti che l' IFN- $\alpha$  ha sui precursori nel sistema ematopoietico (24) non si sa se e quali siano i suoi effetti sulle SP.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello, una volta identificate le SP in campioni di carcinoma ovarico, di valutare l'effetto dell' IFN- $\alpha$  su questa sottopopolazione tumorale.

## **Materiali e metodi**

Lo studio è stato condotto su campioni ottenuti da pazienti affetti da carcinoma ovarico epiteliale alla diagnosi o alla ricaduta e su sei linee primarie di carcinoma ovarico di cui le PDOVCA#1 e le PDOVCA#6 sono state recentemente caratterizzate (25).

L'analisi delle SP è stata possibile grazie al metodo messo a punto da Goodell e collaboratori (4).

L'effetto dell'IFN- $\alpha$ , sulle SP e non-SP è stato valutato tramite: 1) misura della proliferazione cellulare tramite test della [<sup>3</sup>H] Timidina; 2) valutazione della apoptosi tramite analisi della espressione della Annessina-V; 3) analisi del ciclo cellulare.

Dalle SP e non-SP non trattate e trattate con IFN- $\alpha$  è stato estratto l'RNA ed è stata effettuata un'analisi di *microarray*.

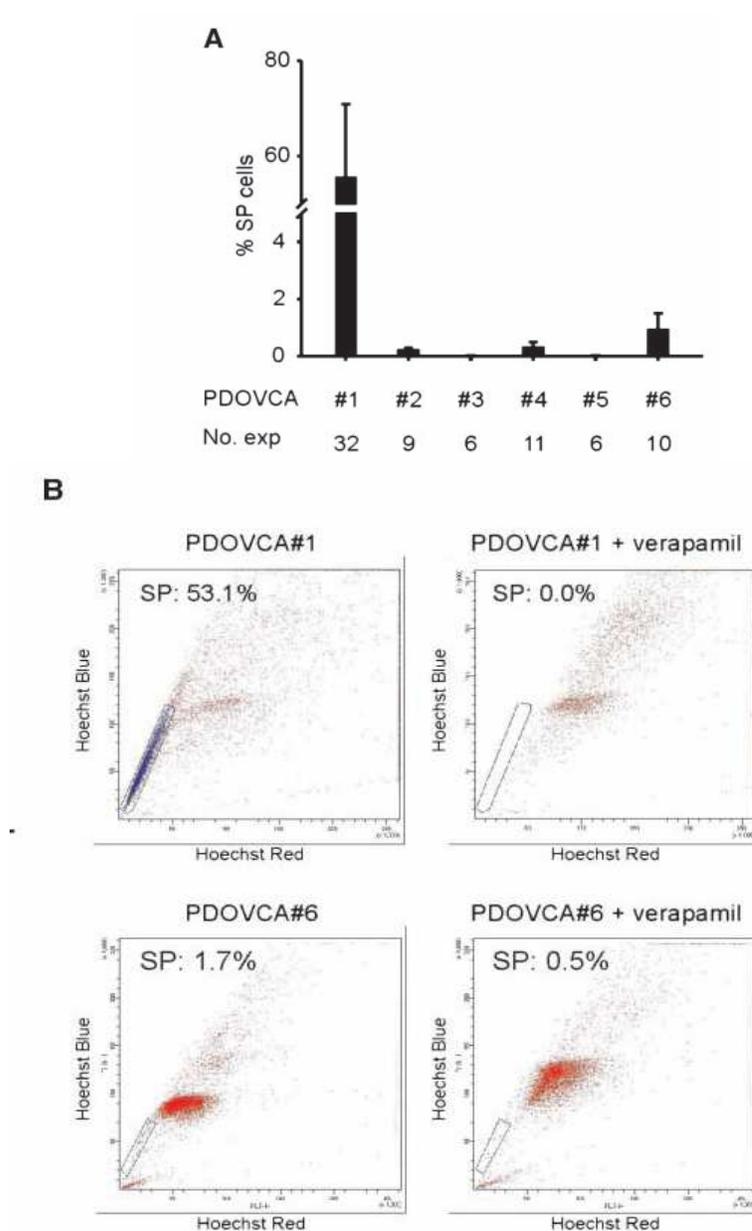
Sono stati poi condotti esperimenti per valutare la tumorigenicità delle SP e della controparte non-SP e l'effetto dell'IFN- $\alpha$  *in vivo*.

## **Risultati**

### **La riduzione del tumore all'ovaio in seguito al trattamento con IFN- $\alpha$ correla con la percentuale delle SP.**

Topi inoculati con due delle linee primarie di carcinoma ovarico utilizzate in questo lavoro e recentemente caratterizzate (25), le PDOVCA#1 e le PDOVCA#6, e trattati una settimana dopo l'inoculo con un vettore lentivirale codificante IFN- $\alpha$ 2 rispondevano in maniera diversa al trattamento con IFN- $\alpha$  (26). La maggior parte dei topi PDOVCA#1 trattati con IFN- $\alpha$  sopravvivevano, mentre i corrispondenti topi di controllo morivano a causa del tumore. Non è stata riscontrata nessuna differenza tra trattato e controllo per quanto riguarda i topi PDOVCA#6. Considerando che recentemente in modelli murinici di carcinoma ovarico ed in un piccolo gruppo di campioni clinici (12) sono state

identificate le SP, si è valutato se la differente risposta delle due linee cellulari al trattamento con IFN- $\alpha$  fosse dovuto ad una diversa percentuale di SP nelle due linee.



**Figura 1:** Le SP nelle linee di carcinoma ovarico analizzate. A: percentuale di SP nelle linee di carcinoma ovarico PDOVCA#1-PDOVCA#6. E' riportato sotto anche il numero delle analisi eseguite per ogni linea. B: plots rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica delle SP PDOVCA#1 e delle SP PDOVCA#6 in seguito alla colorazione con Hoechst 33342 (a sinistra) ed effetto della incubazione con il Verapamile (a destra).

Quindi si sono analizzate per la presenza delle SP le due linee PDOVCA#1 e PDOVCA#6, oltre ad altre quattro linee cellulari primarie di carcinoma ovarico. Le PDOVCA#1 mostrano una percentuale di SP >50%, mentre le PDOVCA#6 e le altre linee presentano una percentuale di SP più bassa. Come controllo del fenotipo SP, una frazione di cellule è stata marcata con Hoechst 33342 in presenza del Verapamile, un inibitore della attività dei trasportatori ABC. Come atteso, il verapamile reverte totalmente il fenotipo SP (Figura 1).

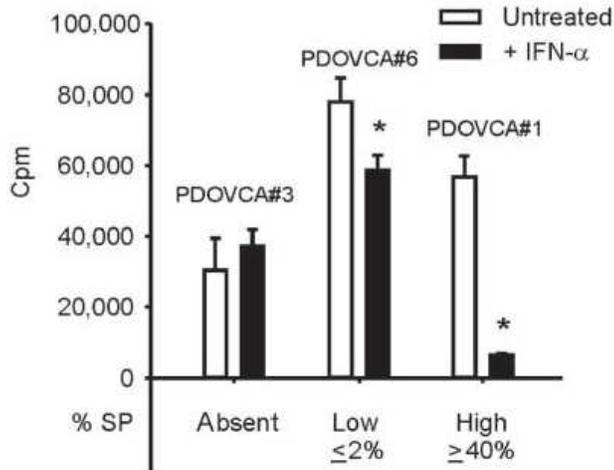
Analizzando 27 campioni di ascite da pazienti affetti da carcinoma ovarico epiteliale, alla diagnosi (n=13) e alla ricaduta (n=14), si sono trovate le SP in 9 su 27 campioni, con una percentuale variabile dallo 0,3% al 9,7%. Una distribuzione simile la si è osservata in pazienti trattati e non trattati, sebbene sia stata trovata una tendenza verso una percentuale più alta di SP in pazienti che avevano ricevuto la chemioterapia. Bassi livelli di SP (*range* 0,1-1,4%) sono stati trovati in colture primarie di cellule epiteliali dell'ovaio normali o immortalizzate. Le percentuali di SP trovate nell'epitelio normale dell'ovaio sono nel *range* dei valori riportati per altri epitelii (0.03-3%; ref 15).

**Le SP sono caratterizzate da una più alta capacità proliferativa, da ridotti livelli di apoptosi e da un'aumentata tumorigenicità rispetto alle non SP.**

Le SP e le non SP sortate dalla linea PDOVCA#1 sono state analizzate subito dopo il sorting delle cellule. Questo è stato facilmente possibile grazie alla elevata percentuale di SP che caratterizzava questa linea, che ha permesso di ottenere un numero adeguato di cellule. Le PDOVCA#1 SP sono caratterizzate dall'essere maggiormente nella fase S e G2-M del ciclo cellulare, mentre la controparte non SP dall'essere bloccate in fase G1 da una maggiore capacità proliferativa rispetto alla controparte non SP e da percentuali di Annessina-V, quindi di apoptosi, più basse rispetto alla controparte non SP. Le differenze nella apoptosi e nella capacità proliferativa tra i due *subsets* correlano con una differente tumorigenicità. Infatti, le PDOVCA#1 SP sono in grado di formare tumori molto più efficientemente e rapidamente rispetto alle non-SP. L'analisi dei tumori formati dalle PDOVCA#1 SP mostrano che contengono sia SP che non-SP in proporzioni simili a quelli misurati nei tumori generati dalla iniezione della popolazione totale, non sortata.

## Gli effetti antiproliferativi dell'IFN- $\alpha$ correlano con la presenza delle SP nelle colture di carcinoma ovarico epiteliale

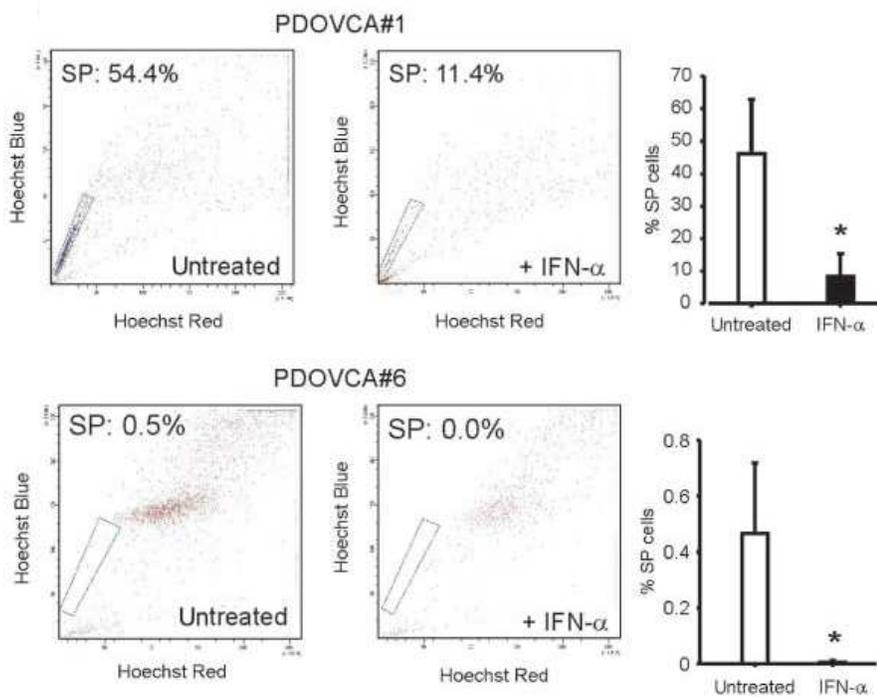
Partendo dal presupposto che l'effetto antitumorale dell'IFN- $\alpha$ , potesse essere legato alla presenza delle SP, sono stati studiati *in vitro* gli effetti di questa citochina su linee caratterizzate da una diversa percentuale di SP. Il trattamento con IFN- $\alpha$  determina una drammatica diminuzione della proliferazione delle PDOVCA#1, che contengono la percentuale di SP più alta (>40%) rispetto alle altre linee (PDOVCA#6 SP <2% e PDOVCA#3 SP assenti) dove gli effetti del trattamento con IFN- $\alpha$  sono meno marcati o nulli (Figura 2).



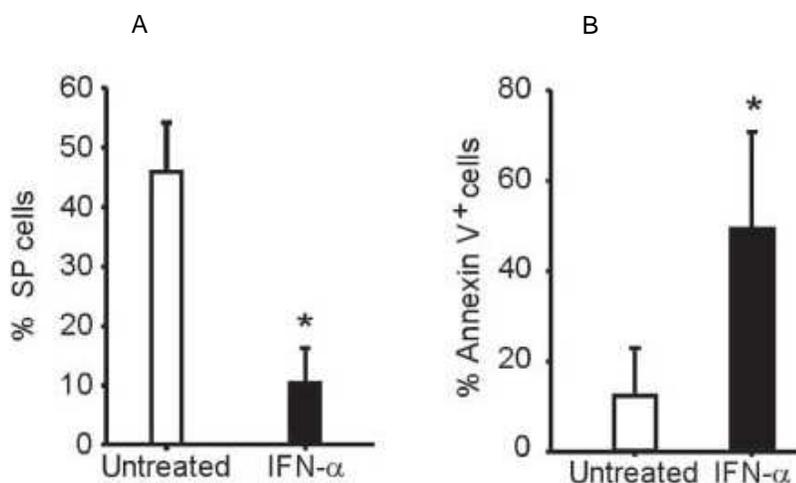
**Figura 2:** Effetto dell'IFN- $\alpha$  sulle SP. Effetto antiproliferativo del IFN- $\alpha$  sulle cellule SP di tre diverse linee, PDOVCA#3, PDOVCA#6, PDOVCA#1 caratterizzate da una percentuale diversa di SP. La proliferazione è stata valutata tramite test della [ $^3$ H] Timidina dopo 7 giorni di trattamento con IFN- $\alpha$ . \* $p < 0.05$

Inoltre *in vitro* l'IFN- $\alpha$  diminuisce drasticamente la percentuale delle cellule SP in tutti i campioni analizzati e fa sì che le cellule perdano l'aspetto sferoide, effetto visibile in particolare nelle PDOVCA#1. Gli effetti dell'IFN- $\alpha$  sulla proliferazione cellulare sono stati confermati anche dal test di clonogenicità, nel quale si vede una drammatica riduzione nel numero delle colonie formate dalle cellule pre-trattate con IFN- $\alpha$  rispetto ai controlli non trattati, ancora una volta soprattutto nelle PDOVCA#1, non nelle PDOVCA#6. Gli stessi esperimenti sono stati effettuati sulle PDOVCA#1 SP e non SP dopo il sorting.

Il trattamento con IFN- $\alpha$  determina una diminuzione della proliferazione delle SP così come una riduzione della loro capacità clonogenica. Le non-SP invece trattate con IFN- $\alpha$  non variano la loro capacità proliferativa, a sostegno del fatto che il calo nella percentuale delle SP non era dovuto ad un parallelo aumento delle non-SP. Inoltre, in 4 esperimenti indipendenti, dopo 7 giorni di coltura delle cellule in presenza di IFN- $\alpha$  la percentuale delle SP diminuiva dal  $45,9 \pm 8,3\%$  dei controlli al  $10,4 \pm 5,8\%$  dei trattati, con contemporaneo aumento delle cellule Annessina positive, dal  $12,4 \pm 10,5\%$  al  $49,4 \pm 21,3\%$  (Figura 4B).



**Figura 3:** Effetto dell'IFN- $\alpha$  sulle SP. Effetto antiproliferativo del IFN- $\alpha$  sulle cellule SP di due linee: PDOVCA#1 e PDOVCA#6. I plots sono rappresentativi della analisi condotta al FACS Sorter delle SP trattate con IFN- $\alpha$  rispetto al controllo non trattato. \* $p < 0.05$



**Figura 4:** Effetto dell'IFN- $\alpha$  sulle SP. A: Effetto antiproliferativo del IFN- $\alpha$  sulle cellule SP della linea PDOVCA#1 sortata e piastrata in assenza/presenza di IFN- $\alpha$ . \* $p < 0.001$ ; B: effetto del trattamento con IFN- $\alpha$  sulle SP per quanto riguarda la percentuale di apoptosi.

L'effetto dell' IFN- $\alpha$  è stato valutato anche sulle SP derivanti da altri tumori: in particolare su una linea di carcinoma del colon-retto, le HT29 e su una linea di medulloblastoma, le DAOY. In entrambe le linee il trattamento con IFN- $\alpha$  determina una riduzione delle SP, indicando che l'IFN- $\alpha$  ha un effetto specifico sulle SP indipendentemente dal tipo di tumore.

#### **Il trattamento con IFN- $\alpha$ determina dei cambiamenti a livello del trascrittoma delle SP purificate rispetto alle non SP**

Sulla base dei risultati ottenuti è stato valutato l'effetto dell'IFN- $\alpha$  sul trascrittoma delle SP purificate. Le PDOVCA#1 SP sono state trattate *in vitro* con IFN- $\alpha$  ed è stato estratto l'RNA (27). L'analisi del profilo di espressione ha indicato che numerosi geni sono fortemente indotti nelle SP trattate con IFN- $\alpha$  e che nessuno viene down-regolato. L'analisi di PCR quantitativa ha confermato cambiamenti trascrizionali, in particolare in 7 tra tutti i geni up-regolati dall'IFN- $\alpha$  nelle SP, in accordo con dati riportati in letteratura (28-33). In particolare è stata trovata un'aumentata espressione di alcuni geni della *signature* trascrizionale dell'IFN- $\alpha$ : GBP1 e TRAIL, coinvolti rispettivamente nel controllo della proliferazione e della apoptosi e CXCL10 una chemochina angiostatica. Il trattamento con IFN- $\alpha$  non altera invece l'espressione dei trasportatori ABCG2 e MDR1. Parecchi trascritti, incluso IFI16, USP18 e PLSCR-1, venivano fortemente up-modulati dall'IFN- $\alpha$  nelle SP, non nelle cellule normali (27). L'analisi del trascrittoma è

stata fatta parallelamente sulle PDOVCA#1 non SP trattate con IFN- $\alpha$  per dare una spiegazione dell'azione specifica dell'IFN- $\alpha$  sulle SP. Innanzitutto si è visto che tutti i trascritti trovati up-regolati nelle non SP trattate con IFN- $\alpha$  erano presenti anche nelle SP trattate con IFN- $\alpha$ . Inoltre 17 trascritti sono stati trovati up-regolati nelle SP, ma non nelle non SP. Alcuni dei geni trovati differenzialmente espressi nelle due sottopopolazioni trattate con IFN- $\alpha$  sono coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare e della differenziazione (34-39).

Infine è stata misurato il livello di espressione dei 7 geni rappresentativi nelle due linee cellulari, le PDOVCA#1 e le PDOVCA#6, rispettivamente sensibili e resistenti al trattamento *in vitro* con IFN- $\alpha$ : i livelli di induzione erano molto più alti nelle PDOVCA#1 rispetto alle PDOVCA#6, a sostegno della ipotesi di una stretta associazione tra la risposta all'IFN- $\alpha$  e la percentuale di SP.

## **Conclusioni**

I risultati di questo lavoro confermano la presenza delle SP in circa il 30% dei 27 campioni analizzati. I livelli di SP sono molto eterogenei (*range* 0-9,7%) e c'è un *trend* di percentuali di SP più alte in pazienti trattati con chemioterapia rispetto a quelli *naïve*. Questo dato non sorprende, considerando la over-espressione dei trasportatori ABCG2 e MDR1, entrambi responsabili sia della resistenza alla chemioterapia che del fenotipo SP. Le percentuali di SP trovate nei campioni non sono comunque paragonabili a quelle trovate nella linea PDOVCA#1 ( $55,4 \pm 15,4\%$ ): il motivo per cui la popolazione SP sia così espansa nella linea PDOVCA#1 rimane una questione aperta.

Ad ogni modo le SP sono caratterizzate da un basso *rate* apoptotico, da un elevato potenziale proliferativo, da una aumentata produzione di fattori angiogenetici quali VEGF e IL-8, rispetto alle non SP e anche questo potrebbe spiegare la loro più elevata tumorigenicità. Viceversa è meno chiaro se le SP derivate da carcinoma ovarico possano essere veramente arricchite in cellule staminali: da una parte, infatti, le SP hanno la potenzialità di ricostruire la complessità del tumore originario, ma dall'altra l'espressione dei canonici marcatori di staminalità non è significativamente diversa tra le SP e le non-SP. Inoltre la dose tumorigenica delle PDOVCA#1 SP è relativamente elevata rispetto a quella trovata in altri studi (11) e sia le SP che le non SP sono in grado di formare tumore, anche se con efficienza e cinetiche diverse. In questo senso ulteriori

esperimenti saranno necessari per approfondire questo aspetto e trovare marcatori che possano all'interno delle SP definire in modo più specifico la componente staminale (40).

Il risultato più importante di questo lavoro è che le SP sono un target dell'azione dell'IFN- $\alpha$ , che ne causa *in vitro* una drammatica riduzione, associata ad effetti antiproliferativi e pro-apoptotici, ad una diminuzione della morfologia di neurosfera, che si sa essere una caratteristica di staminalità (41).

Analisi di *microarray* hanno dimostrato che il trattamento delle SP con IFN- $\alpha$  determina una up-regolazione di alcuni geni, in particolare il gene pro-apoptotico TRAIL e il gene antiproliferativo GPB-1. Inoltre è stato trovato up-regolato il gene IFI16 che codifica per una fosfoproteina coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, della differenziazione e della apoptosi (34). Questi geni potrebbero essere coinvolti nella attività antiproliferativa e pro-apoptotica esercitata dall' IFN- $\alpha$  sulle cellule SP.

E' importante sottolineare come le SP derivanti da tumori di origine diversa e contenenti un numero eterogeneo di cellule siano modulate negativamente dall'IFN- $\alpha$  *in vitro*, indice che il fenomeno osservato non è ristretto solo alle SP isolate dai tumori ovarici. In accordo con gli esperimenti *in vitro*, il trattamento con IFN- $\alpha$  di tumori caratterizzati da una elevata percentuale di SP ha un significativo effetto antitumorale rispetto ai tumori caratterizzati da una percentuale di SP più bassa. Questi risultati potrebbero avere un' importante rilevanza clinica. L' IFN- $\alpha$  è usato per trattare pazienti con tumori solidi, incluso il tumore ovarico epiteliale, generalmente con limitati risultati clinici (42, 43), anche se occasionalmente è stato riportato qualche risultato positivo (21-23). I risultati ottenuti in questo lavoro suggeriscono che lo screening di campioni di carcinoma ovarico per la presenza delle SP potrebbe rappresentare la base per una somministrazione di IFN- $\alpha$  a quei pazienti che presentano una percentuale elevata di SP, in combinazione con i classici chemioterapici. La somministrazione combinata dell'IFN- $\alpha$  e degli altri farmaci potrebbe far sì che vengano eliminate sia le non SP che la frazione SP, probabilmente più resistente a causa della over-espressione dei trasportatori MDR1 e ABCG2 (44).

## Bibliografia

1. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumour stem cells. *Oncogene* 2004;23:7274–82.
2. Miller SJ, Lavker RM, Sun TT. Interpreting epithelial cancer biology in the context of stem cells: tumour properties and therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta* 2005;1756:25–52
3. Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 2006;12:296–300.
4. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med* 1996;183:1797–806.
5. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001;7:1028–34.
6. Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006;44:240–51.
7. Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006;24:506–13.
8. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14228–33.
9. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:781–6.
10. Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, et al. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology* 2007;148:1797–803.
11. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2– cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 2005;65:6207–19.
12. Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:11154–9.
13. Challen GA, Bertoncello I, Deane JA, Ricardo SD, Little MH. Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1896–912.
14. Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 2006;24:3–12.
15. Triel C, Vestergaard ME, Bolund L, Jensen TG, Jensen UB. Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp Cell Res* 2004;295:79–90.
16. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:275–84.
17. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444:756–60.

18. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006;6:836–48.
19. Gresser I. The antitumor effects of interferon: a personal history. *Biochimie* 2007;89:723–8
20. Gresser I, Belardelli F. Endogenous type I interferons as a defense against tumors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:111–8.
21. Berek JS, Hacker NF, Lichtenstein A, et al. Intraperitoneal recombinant  $\alpha$ -interferon for "salvage" immunotherapy in stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer Res* 1985;45:4447–53.
22. Nardi M, Cognetti F, Pollera CF, et al. Intraperitoneal recombinant  $\alpha$ 2-interferon alternating with cisplatin as salvage therapy for minimal residual-disease ovarian cancer: a phase II study. *J Clin Oncol* 1990;8:1036–41.
23. Willemse PH, de Vries EG, Mulder NH, Aalders JG, Bouma J, Sleijfer DT. Intraperitoneal human recombinant interferon  $\alpha$ 2b in minimal residual ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1990;26:353–8.
24. Guilhot F, Roy L, Guilhot J, Millot F. Interferon therapy in chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18:585–603.
25. Indraccolo S, Tisato V, Agata S, et al. Establishment and characterization of xenografts and cancer cell cultures derived from BRCA1-/- epithelial ovarian cancers. *Eur J Cancer* 2006;42:1475–83.
26. Indraccolo S, Tisato V, Tosello V, et al. Interferon- $\alpha$  gene therapy by lentiviral vectors contrasts ovarian cancer growth through angiogenesis inhibition. *Hum Gene Ther* 2005;16:957–70.
27. Indraccolo S, Pfeffer U, Minuzzo S, et al. Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells. *J Immunol* 2007;178:1122–35.
28. De Veer MJ, Holko M, Frevel M, et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 2001;69:912–20.
29. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15623–8.
30. Ji X, Cheung R, Cooper S, Li Q, Greenberg HB, He XS. Interferon- $\alpha$  regulated gene expression in patients initiating interferon treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;37:610–21.
31. Krepler C, Certa U, Wacheck V, Jansen B, Wolff K, Pehamberger H. Pegylated and conventional interferon- $\alpha$  induce comparable transcriptional responses and inhibition of tumor growth in a human melanoma SCID mouse xenotransplantation model. *J Invest Dermatol* 2004;123:664–9.
32. Taylor MW, Grosse WM, Schaley JE, et al. Global effect of PEG-IFN- $\alpha$  and ribavirin on gene expression in PBMC *in vitro*. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24:107–18.
33. Tracey L, Spiteri I, Ortiz P, Lawler M, Piris MA, Villuendas R. Transcriptional response of T cells to IFN- $\alpha$ : changes induced in IFN- $\alpha$ -sensitive and resistant cutaneous T cell lymphoma. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24:185–95.
34. De Andrea M, Gioia D, Mondini M, et al. Effects of IFI16 overexpression on the growth and doxorubicin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma-derived cell lines. *Head Neck* 2007;29:835–44.
35. Guenzi E, Topolt K, Cornali E, et al. The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J* 2001;20:5568–77.

36. Kang D, Jiang H, Wu Q, Pestka S, Fisher PB. Cloning and characterization of human ubiquitin-processing protease-43 from terminally differentiated human melanoma cells using a rapid subtraction hybridization protocol RaSH. *Gene* 2001;267:233-42.
37. Kang DC, Gopalkrishnan RV, Lin L, et al. Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* 2004;23:1789-800.
38. Li CF, MacDonald JR, Wei RY, et al. Human sterile motif domain 9, a novel gene identified as down-regulated in aggressive fibromatosis, is absent in the mouse. *BMC Genomics* 2007;8:92.
39. Zhao KW, Li X, Zhao Q, et al. Protein kinase C $\delta$  mediates retinoic acid and phorbol myristate acetate-induced phospholipid scramblase 1 gene expression: its role in leukemic cell differentiation. *Blood* 2004;104:3731-8.
40. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007;58:267-84.
41. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005;65:5506-11. 41
42. Berek JS. Interferon plus chemotherapy for primary treatment of ovarian cancer. *Lancet* 2000;356:6-7.
43. Hall GD, Brown JM, Coleman RE, et al. Maintenance treatment with interferon for advanced ovarian cancer: results of the Northern and Yorkshire gynaecology group randomised phase III study. *Br J Cancer* 2004;91:621-6.
44. Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res* 2006;312:3701-10.

## Parte III

### **Medulloblastoma stem cells survival: role of Notch1 signalling activation under hypoxia**

Francesca Pistollato<sup>1\*</sup>, Elena Rampazzo<sup>1</sup>, Luca Persano<sup>1</sup>, Sara Abbadi<sup>1</sup>,  
Chiara Frasson<sup>1</sup>, Luca Denaro<sup>2</sup>, Domenico D'Avella<sup>2</sup>, David M. Panchision<sup>3</sup>,  
Alessandro Della Puppa<sup>2</sup>, Renato Scienza<sup>2</sup> and Giuseppe Basso<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Hemato-Oncology Laboratory, Department of Paediatrics, University of Padova, Italy

<sup>2</sup> Department of Neurosurgery, University of Padova, Italy

<sup>3</sup> Division of Neuroscience and Basic Behavioral Science, National Institute of Mental  
Health, National Institutes of Health, Bethesda, MD

Sottomesso a the American Journal of Pathology

---

Nel corso dell'ultimo anno la nostra ricerca si è concentrata anche sulla caratterizzazione delle CSCs in linee cellulari e in colture primarie sia di medulloblastoma (MDB) che di glioblastoma (GBM).

E' noto che il microambiente o nicchia del tumore influenza la distribuzione della CSCs all'interno della massa tumorale e la loro resistenza alle radiazioni. Ci sono poi alcune evidenze che l'ipossia può favorire l'espansione delle cellule staminali e il mantenimento del tumore. Inoltre, studi preclinici e clinici indicano che c'è una relazione inversa tra andamento del tumore e l'ipossia

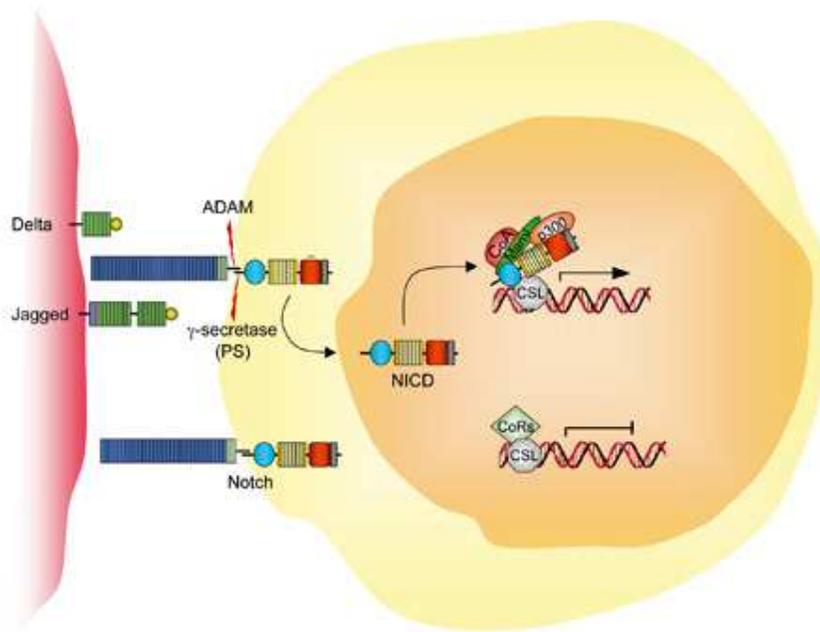
Sulla base di queste considerazioni, in questo lavoro abbiamo indagato il legame tra il microambiente ipossico e alcune vie del segnale (Notch1, HIF-1 $\alpha$ ) che sembrano essere coinvolte nel sostenere la crescita delle cellule di MDB.



## Introduzione

Il Medulloblastoma (MDB) è il più comune tumore cerebrale dell'età pediatrica, rappresentando il 20-25% di tutti i tumori pediatrici. Sono tumori tipicamente maligni, invasivi a livello del cervelletto, caratterizzati da una differenziazione neuronale e una tendenza a metastizzare attraverso il flusso cerebro spinale. Si sa che il MDB origina dalle cellule staminali del cervelletto bloccate nel processo di divisione e di differenziazione nei diversi tipi di cellule (1).

Nelle cellule di MDB c'è una più alta attivazione endogena della via di Notch (2-5), una via cruciale nel promuovere la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule staminali neuronali neoplastiche, inibendo la loro differenziazione (6-7). Il *signaling* di Notch inizia con il legame del ligando (Delta-like 1, 3 o 4 o Jagged 1 e 2) con il recettore (Notch 1-4), seguito da un taglio proteolitico del recettore da parte del complesso delle gamma secretasi.



**Figura 1:** Il pathway di Notch. Notch è espresso come proteina eterodimerica sulla superficie della cellula. Il signaling di Notch si attiva dopo il legame tra il ligando (Notch 1-4) e il recettore (Jagged 1 e 2; Delta like 1, 3 e 4) risultando in due tagli proteolitici: il primo a livello extracellulare mediato dalle proteine della famiglia ADAM, il secondo a livello trans-membrana grazie all'azione delle  $\gamma$ -secretasi. In questo modo viene rilasciato il dominio intracellulare di Notch (NICD) che va nel nucleo e si associa con CSL, al quale si legano fattori di trascrizione e co-attivatori (CoA) come MAML (Mastermind like proteins) e p300 (www. Isrec.com).

Inibitori di questa via rallentano la crescita dei tumori dipendenti dalla attivazione di Notch, come il MDB e la leucemia a cellule T (3-4). Nei tumori cerebrali embrionali l'inibizione di Notch porta ad una deplezione selettiva della frazione staminale tumorale (2). Inoltre, i tumori cerebrali sembrano essere caratterizzati da una ipossia intra-tumorale. Dati recenti mostrano l'ambiente ipossico sembra correlare con la aggressività del tumore (8-10) e che una iper-attivazione di HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia-inducible factor*) è implicata nella progressione del tumore (11). L'ipossia ha un ruolo determinante in alcune normali risposte fisiologiche quali la crescita del corpo carotideo e la generazione di una nuova cresta neurale derivata dalle cellule del glomo (12), nella angiogenesi (13) ed è implicata nella regolazione di alcune importanti vie, come quella di BMP (*Bone Morphogenetic Protein*)(14), di Akt/mTOR (15) e appunto di Notch (16).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare se l'ipossia e HIF-1 $\alpha$  modulassero la via di Notch in cellule primarie di MDB. I risultati indicano che l'ipossia sembra essere cruciale nel mantenimento della sopravvivenza delle cellule staminali di MDB e che questo fenomeno dipende dalla stretta cooperazione tra HIF-1 $\alpha$  e Notch1.

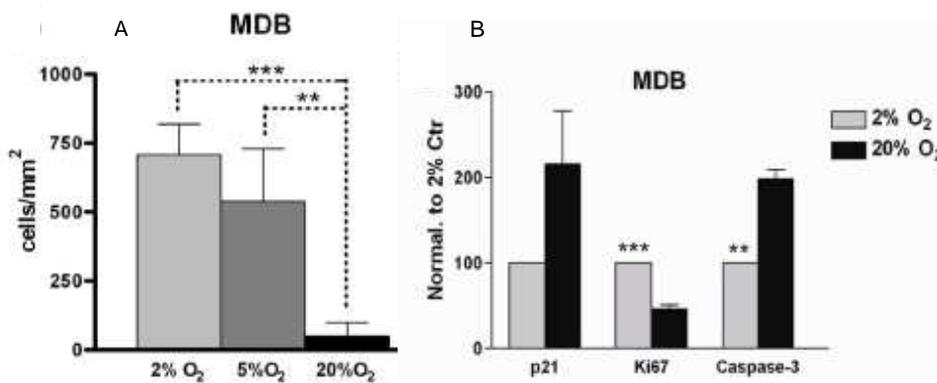
## **Materiali e metodi**

Lo studio è stato condotto su cellule primarie di MDB ottenute da 8 pazienti all'esordio di malattia. Nel tentativo di comprendere se ci fosse e, in caso affermativo, quale fosse il *link* tra ipossia, HIF-1 $\alpha$  e Notch1 nel mantenimento della componente staminale nelle colture primarie di MDB le cellule sono state coltivate sia in condizioni di ipossia che di normossia e sono stati eseguiti esperimenti di Western blot, di immunocitochimica e di immunohistochimica. Sono stati analizzati i seguenti marcatori: Ki67 (marcatore di proliferazione), Caspasi-3 attivata e p21<sup>cip1</sup>, (rispettivamente indicatori di aumentata apoptosi e blocco della mitosi), Nestina (marcatore dei precursori multipotenti), GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) (marcatore specifico degli astrociti e della glia radiale),  $\beta$ III-Tubulina (marcatore delle cellule *committed* e neuronali). Le cellule sono state poi caratterizzate anche dal punto di vista fenotipico con due marcatori specifici, il CD15 ed il CD133 (17).

## Risultati

**L'ipossia espande preferenzialmente le cellule di MDB Nestina-positive, mentre l'esposizione ad un'elevata tensione di O<sub>2</sub> induce una differenziazione neuronale e aumenta l'apoptosi.**

Considerando che cellule normali derivate dalla zona sub-ventricolare (SVZ) del cervelletto proliferano meglio ad una bassa tensione di O<sub>2</sub> (5% di O<sub>2</sub>) e che cellule primarie di glioblastoma necessitano di una bassa tensione di O<sub>2</sub> (2% di O<sub>2</sub>) per sopravvivere (18), abbiamo valutato quali fossero gli effetti indotti dalla ipossia sulle cellule di MDB. In particolare l'esposizione al 2% di O<sub>2</sub> (ipossia) promuove l'espansione ed una sopravvivenza a lungo termine delle cellule derivate da MDB, mentre l'esposizione al 20% di O<sub>2</sub> (normossia) determina una riduzione significativa del numero di cellule e, in alcuni casi, una sopravvivenza non superiore a due passaggi consecutivi (Figura 2A). In ipossia è inoltre fortemente espresso il marcatore di proliferazione Ki67, indice di una più pronunciata attività mitotica, mentre l'esposizione delle cellule ad una maggiore tensione di O<sub>2</sub> comporta un aumento della espressione della forma attiva della caspasi 3 e di p21<sup>cip1</sup>, indicative rispettivamente di un'aumentata apoptosi e di un blocco della attività mitotica (Figura 2B). Questi risultati indicano quindi che la esposizione delle cellule di MDB ad una tensione di O<sub>2</sub> non fisiologica induce morte cellulare ed un arresto della mitosi.



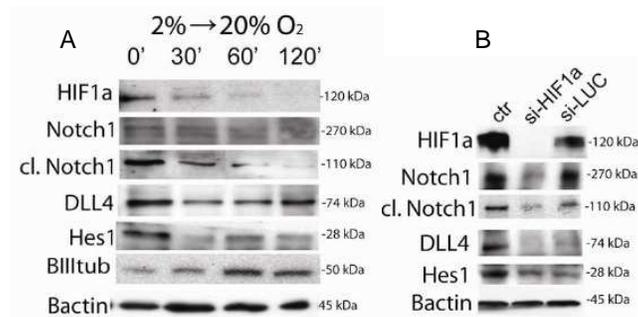
**Figura 2:** Il 2% di O<sub>2</sub> promuove l'espansione e la sopravvivenza delle cellule di MDB. A: figura rappresentativa delle linee di MDB HuTu33 espansa al 2%, al 5% e al 20% di O<sub>2</sub>. B: L'esposizione acuta al 20% di O<sub>2</sub> promuove un differenziamento in senso neuronale. Percentuali di cellule positive rispetto al totale dei nuclei DAPI+, normalizzati sul controllo al 2% di O<sub>2</sub> \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Marcatori specifici delle cellule del SNC sono la Nestina, marcatore dei precursori multipotenti (19), la GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*)(20), marcatore specifico degli astrociti e della glia radiale, e la  $\beta$ III-Tubulina (21), un marcatore delle cellule

*committed* e neuronali. Le cellule di MDB se esposte ad una elevata tensione di O<sub>2</sub> per 48h aumentano la percentuale delle cellule  $\beta$ III-Tubulina positive, quindi più differenziate, a discapito delle cellule Nestina positive, quindi più staminali, e perciò vengono indotte a differenziare. Questo ad indicare che in un certo modo l'ipossia preserva l'espansione e la sopravvivenza delle cellule di MDB più immature, mentre una esposizione acuta ad un'elevata tensione di O<sub>2</sub> induce una differenziazione in senso neuronale.

### **L'esposizione acuta ad una elevata tensione di O<sub>2</sub> promuove l'inibizione del signaling di Notch**

Considerando che l'esposizione ad una elevata tensione di O<sub>2</sub> induce le cellule di MDB a differenziare e che la via di Notch è considerata essere determinante nel promuovere da una parte la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule staminali sia normali che tumorali, dall'altra nell'inibire la loro differenziazione (3,4,7,22,23) si è valutato quale fosse il meccanismo alla base della induzione del differenziamento in seguito all'esposizione ad un'elevata tensione di O<sub>2</sub>. Si è visto che l'esposizione delle cellule di MDB ad una elevata tensione di O<sub>2</sub> determina oltre alla degradazione di HIF-1 $\alpha$ , l'inibizione di Notch e la down-regolazione transiente di Dll4 (*Delta-like protein 4*), uno dei suoi ligandi (Figura 3A).



**Figura 3:** L'esposizione acuta ad un'elevata tensione di O<sub>2</sub> determina l'inibizione di Notch1 e HIF-1 $\alpha$  è richiesto per mantenere Notch1 attivato. A: Western Blot rappresentativi della analisi di HIF-1 $\alpha$ , Notch1, Dll4, Hes1,  $\beta$ III-Tubulina e  $\beta$ actina (controllo) in cellule di MDB espanso al 2% di O<sub>2</sub> e poi esposte al 20% di O<sub>2</sub> per 30, 60 o 120 minuti. B: Western Blot rappresentativi della analisi di HIF-1 $\alpha$ , Notch1, Dll4, Hes1 e  $\beta$ actina (controllo) in cellule di MDB espanso al 2% di O<sub>2</sub> nelle quali HIF-1 $\alpha$  è stato silenziato.

Inoltre l'analisi della espressione di Dll4 su tessuto di MDB rivela che la maggiore espressione di questo ligando si ha a livello delle aree meno vascolarizzate e quindi più ipossiche della massa tumorale, in accordo con precedenti lavori che riportano che

l'espressione di Dll4 è indotta da VEGF-A e dalla ipossia (24). Un *target gene* di Notch1 è Hes1, il cui ruolo è quello di inibire la neurogenesi e mantenere le cellule staminali neuronali (25). L'esposizione ad una elevata tensione di O<sub>2</sub> determina anche una down-regolazione di Hes1, ad indicare che l'ipossia può preservare le cellule di MDB dal differenziare mantenendo quindi HIF-1 $\alpha$ , Notch1/Hes1 altamente espresse. L'attivazione di Notch, mantenendo le cellule indifferenziate, contribuisce alla proliferazione e alla sopravvivenza delle cellule di MDB (4). La  $\beta$ III-Tubulina è up-regolata nelle cellule di MDB progressivamente esposte ad una tensione di O<sub>2</sub> elevata, a conferma dell'induzione alla differenziazione dipendente dall' O<sub>2</sub> (Figura 3A).

**HIF-1 $\alpha$  e Notch1 sono co-espresse nelle cellule immature di MDB e HIF-1 $\alpha$  è richiesto per mantenere Notch attivo.**

L'analisi di HIF-1 $\alpha$ , il più importante sensore dell'Ossigeno, ha rivelato che l'esposizione ad una elevata tensione di O<sub>2</sub>, promuove una sua progressiva degradazione. Silenziando, quindi inibendo, HIF-1 $\alpha$ , le cellule tendono a differenziare e a morire dopo pochi giorni. E' quindi necessario che HIF-1 $\alpha$  sia stabile e non degradato per preservare la vitalità delle cellule di MDB. Nelle cellule nelle quali HIF 1 $\alpha$  è stato silenziato, anche il *pathway* di Notch1 risulta down-regolato (Figura 3B). Analisi di immunohistochimica su tessuto di MDB mostrano che Notch1/Hes1 e HIF-1 $\alpha$  sono co-espresi. Quindi HIF 1 $\alpha$  è richiesto nel mantenere il *signaling* di Notch attivato nelle cellule di MDB.

**La modulazione del *signaling* di Notch1 altera la stabilità di HIF 1 $\alpha$**

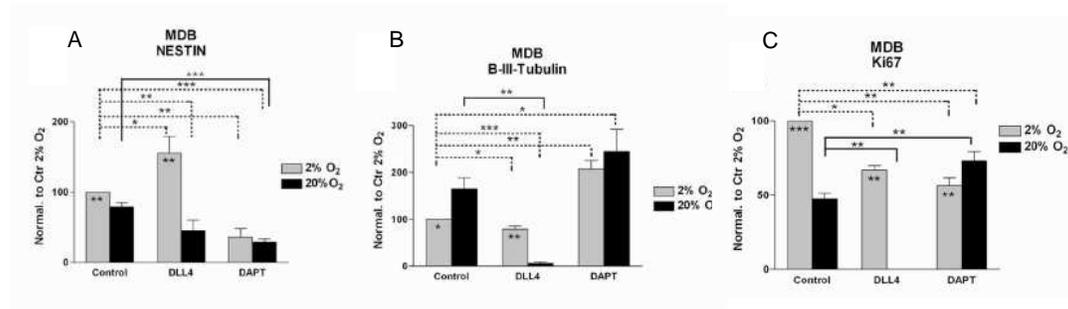
Per valutare se la modulazione esogena della via di Notch venisse regolata in maniera differente in ipossia ed in normossia e se la stabilità di HIF-1 $\alpha$  dipendesse dalla attivazione ed inibizione esogena di Notch1, le cellule di MDB sono state trattate con Dll4, un attivatore della via di Notch e con DAPT, un inibitore delle gamma secretasi (26-28). I risultati ottenuti dimostrano che la via di Notch1 è più fortemente attivata in condizioni di ipossia e in particolare trattando le cellule con Dll4: ad un aumento della isoforma attiva di Notch1, corrisponde una diminuzione delle cellule più differenziate  $\beta$ III-Tubulina positive. Viceversa trattando le cellule con DAPT si ha l'inibizione di Notch1 soprattutto quando le cellule vengono esposte ad una elevata tensione di O<sub>2</sub>.

La stimolazione con Dll4, in ipossia, non altera l'espressione di HIF-1 $\alpha$ , mentre l'inibizione di Notch con DAPT determina una sua destabilizzazione con un probabile coinvolgimento delle proline idrossilasi, in particolare di PHD2.

Notch1 è quindi attivato preferenzialmente nelle cellule di MDB mantenute in ipossia.

### La modulazione di Notch cambia il fenotipo delle cellule di MDB in modo O<sub>2</sub> dipendente

E' stato riportato che l'ipossia mantiene il fenotipo staminale (9,10,14), inibendo la differenziazione e che l'espressione di HIF 1 $\alpha$  è legata alla acquisizione di un fenotipo più immaturo (16). Recentemente inoltre si è visto che l'inibizione del *pathway* di Notch nelle DAOY, linea cellulare di MDB, depleta le cellule staminali e blocca il loro *engraftment in vivo* (2). Dal momento che nelle cellule trattate con DAPT esogeno si ha la degradazione di HIF-1 $\alpha$  e che HIF-1 $\alpha$  è richiesto nel mantenere il *signaling* di Notch1 attivato, siamo andati a vedere se il trattamento con il DAPT induceva un differenziamento nelle cellule di MDB.



**Figura 3:** La modulazione del signalling di Notch tramite Dll4 e DAPT influisce sul fenotipo delle cellule in modo dipendente dalla ipossia. A, B e C: Istogrammi rappresentativi, normalizzati sul controllo, di espressione della Nestina (A), della  $\beta$ III-Tubulina (B) e del Ki67 (C) in cellule di MDB trattate con Dll4 e DAPT al 2% e al 20% di O<sub>2</sub> \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Ed infatti trattando le cellule di MDB con il DAPT, quindi inibendo la via di Notch, si ha una differenziazione in senso neuronale, dimostrata da una diminuzione delle cellule Nestina positive (Figura 3A) e da un aumento delle cellule  $\beta$ III-Tubulina positive (Figura 3B), sia al 2% che al 20% di O<sub>2</sub>.

Inoltre anche il numero totale delle cellule e l'espressione del Ki67 vengono ridotti dal trattamento con DAPT in particolare in ipossia, non nelle cellule esposte ad una tensione di O<sub>2</sub> elevata, condizione nella quale le cellule risultano proliferare di più in presenza di DAPT (Figura 3C). Questi risultati suggeriscono che inibendo la via di Notch1 con il DAPT, le cellule di MDB vengono prima di tutto indotte a differenziare

in senso neuronale e risultano, quando esposte ad una elevata tensione di O<sub>2</sub>, più resistenti al trattamento con il DAPT. Viceversa, attivando il *signaling* di Notch1 con Dll4 si ha un modesto aumento delle cellule CD133 positive e Nestina positive (più staminali) in ipossia, con un concomitante calo delle cellule  $\beta$ III-Tubulina positive (più differenziate) (Figura 3A e B). Inoltre le cellule trattate con Dll4 in ipossia diminuiscono di poco l'espressione del Ki67, probabilmente per l'acquisizione di caratteristiche di *slow dividing stem cells*, ma quando esposte ad una elevata tensione di O<sub>2</sub> sia il numero totale delle cellule che l'espressione del marcatore Ki67 diminuiscono in modo significativo. Una possibile spiegazione a questo fenomeno è che l'attivazione di Notch1 da parte di Dll4, mantenendo le cellule in uno stato indifferenziato, fa sì che le cellule precursori del MDB siano più vulnerabili alla esposizione ad un'elevata tensione di O<sub>2</sub>, mentre l'inibizione di Notch1 da parte del DAPT reverte questo effetto inducendo una differenziazione neuronale e aumentando la vitalità.

## **Conclusioni**

E' stato recentemente suggerito che il MDB sia caratterizzato dalla presenza di cellule staminali, le probabili responsabili della recidiva del tumore. Inoltre è stato dimostrato come il *signaling* di Notch sia importante nel promuovere la sopravvivenza e nel sostenere la proliferazione delle cellule staminali neuronali e nell'inibire la loro differenziazione (6-7). Inoltre inibitori di Notch rallentano la crescita dei tumori che dipendono dalla attivazione di Notch, come il MDB e la leucemia a cellule T (3,4), depletando la frazione staminale. E' stato poi riportato il ruolo della ipossia come caratteristica chiave della nicchia del cervello (29) e il fatto che l'ambiente ipossico e HIF-1 $\alpha$  correlano fortemente con la aggressività del tumore (8-11,14). HIF-1 $\alpha$  è implicato nella regolazione di molte vie del segnale, come BMP, Akt/mTOR e Notch (14-16). Gustafsson e collaboratori hanno dimostrato che HIF-1 $\alpha$  e Notch interagiscono fisicamente in cellule progenitrici murine.

Questo lavoro ha avuto lo scopo di mettere in relazione l'ipossia, HIF-1 $\alpha$  e Notch1 in cellule primarie di MDB, per capire quale fosse il loro ruolo nel mantenimento della componente staminale e più resistente ai chemioterapici del tumore. I primi risultati ottenuti dimostrano che le cellule di MDB, che possono essere espanse *in vitro* solo quando mantenute in condizioni ipossiche, se esposte ad una maggiore tensione di O<sub>2</sub>

tendono a differenziare e a morire e questo fenomeno avviene tramite l'inibizione di Notch1. Il *signaling* di Notch risulta essere quindi attivato dalla ipossia e da HIF-1 $\alpha$ , e inibito dalla esposizione ad una tensione di O<sub>2</sub> maggiore o dal silenziamento di HIF-1 $\alpha$ . Quindi la sopravvivenza delle cellule di MDB e il mantenimento della staminalità sono controllate da Notch in un ambiente ipossico. Quindi il mantenimento del *pool* di cellule staminali nel MDB, che potrebbero essere quelle responsabili della ricaduta, dipende dalla cooperazione di HIF-1 $\alpha$  e di Notch. Questi risultati potrebbero essere interessanti nel tentativo di capire meglio la biologia del MDB ed il ruolo della ipossia nel controllare alcune vie chiave, come quella di Notch1.

## Bibliografia

1. Fan X, Eberhart CG: Medulloblastoma stem cells, *J Clin Oncol* 2008, 26:2821-2827
2. Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li YM, Eberhart CG: Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors, *Cancer Res* 2006, 66:7445-7452
3. Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, Ni X, Wang Y, Ball D, Brat DJ, Perry A, Eberhart CG: Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth, *Cancer Res* 2004, 64:7787-7793
4. Hallahan AR, Pritchard JI, Hansen S, Benson M, Stoeck J, Hatton BA, Russell TL, Ellenbogen RG, Bernstein ID, Beachy PA, Olson JM: The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas, *Cancer Res* 2004, 64:7794-7800
5. Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD: Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations, *Cancer Res* 1997, 57:842-845
6. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature* 2001, 414:105-111
7. Solecki DJ, Liu XL, Tomoda T, Fang Y, Hatten ME: Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation, *Neuron* 2001, 31:557-568
8. Azuma Y, Chou SC, Lininger RA, Murphy BJ, Varia MA, Raleigh JA: Hypoxia and differentiation in squamous cell carcinomas of the uterine cervix: pimonidazole and involucrin, *Clin Cancer Res* 2003, 9:4944-4952
9. Helczynska K, Kronblad A, Jogi A, Nilsson E, Beckman S, Landberg G, Pahlman S: Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ, *Cancer Res* 2003, 63:1441-1444
10. Jogi A, Ora I, Nilsson H, Lindeheim A, Makino Y, Poellinger L, Axelson H, Pahlman S: Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:7021-7026
11. Smith K, Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, Mekhail K, Lee S: Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer, *Cancer Res* 2005, 65:5221-5230

12. Pardal R, Ortega-Saenz P, Duran R, Lopez-Barneo J: Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body, *Cell* 2007, 131:364-377
13. Wong ET, Brem S: Antiangiogenesis treatment for glioblastoma multiforme: challenges and opportunities, *J Natl Compr Canc Netw* 2008, 6:515-522
14. Pistollato F, Chen HL, Rood BR, Zhang HZ, D'Avella D, Denaro L, Gardiman M, te Kronnie G, Schwartz PH, Favaro E, Indraccolo S, Basso G, Panchision DM: Hypoxia and HIF1alpha repress the differentiative effects of BMPs in high-grade glioma, *Stem Cells* 2009, 27:7-17
15. Pistollato F, Rampazzo E, Abbadi S, Della Puppa A, Scienza R, D'Avella D, Denaro L, Te Kronnie G, Panchision DM, Basso G: Molecular mechanisms of HIF-1alpha modulation induced by oxygen tension and BMP2 in glioblastoma derived cells, *PLoS One* 2009, 4:e6206
16. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M: Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state, *Dev Cell* 2005, 9:617-628
17. Panchision DM, Chen HL, Pistollato F, Papini D, Ni HT, Hawley TS: Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24, *Stem Cells* 2007, 25:1560-1570
18. Pistollato F, Chen HL, Schwartz PH, Basso G, Panchision DM: Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes, *Mol Cell Neurosci* 2007, 35:424-435
19. Tohyama T, Lee VM, Rorke LB, Marvin M, McKay RD, Trojanowski JQ: Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells, *Lab Invest* 1992, 66:303-313
20. Casper KB, McCarthy KD: GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS, *Mol Cell Neurosci* 2006, 31:676-684
21. Memberg SP, Hall AK: Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin, *J Neurobiol* 1995, 27:26-43
22. Gaiano N, Fishell G: The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates, *Annu Rev Neurosci* 2002, 25:471-490
23. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC: Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia, *Science* 2004, 306:269-271
24. Williams CK, Li JL, Murga M, Harris AL, Tosato G: Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function, *Blood* 2006, 107:931-939
25. Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T: Roles of Hes genes in neural development, *Dev Growth Differ* 2008, 50 Suppl 1:S97-103
26. Ikeuchi T, Sisodia SS: Cell-free generation of the notch1 intracellular domain (NICD) and APP-CTFgamma: evidence for distinct intramembranous "gamma-secretase" activities, *Neuromolecular Med* 2002, 1:43-54
27. Martys-Zage JL, Kim SH, Berechid B, Bingham SJ, Chu S, Sklar J, Nye J, Sisodia SS: Requirement for presenilin 1 in facilitating lagged 2-mediated endoproteolysis and signaling of notch 1, *J Mol Neurosci* 2000, 15:189-204

28. Schroeter EH, Ilagan MX, Brunkan AL, Hecimovic S, Li YM, Xu M, Lewis HD, Saxena MT, De Strooper B, Coonrod A, Tomita T, Iwatsubo T, Moore CL, Goate A, Wolfe MS, Shearman M, Kopan R: A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:13075-13080
29. Ljungkvist AS, Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ: Dynamics of tumor hypoxia measured with bioreductive hypoxic cell markers, *Radiat Res* 2007, 167:127-145

## Parte IV

### **Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma**

Francesca Pistollato<sup>1\*</sup>, Sara Abbadi<sup>1</sup>, Elena Rampazzo<sup>1</sup>, Luca Persano<sup>1</sup>,  
Alessandro Della Puppa<sup>2</sup>, Chiara Frasson<sup>1</sup>, Eva Sarto<sup>1</sup>, Renato Scienza<sup>2</sup>, Domenico  
D'Avella<sup>2</sup> and Giuseppe Basso<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Hemato-Oncology Laboratory, Department of Paediatrics, University of Padova, Italy

<sup>2</sup> Department of Neurosurgery, University of Padova, Italy

Sottomesso a Stem Cells

---

Nel corso dell'ultimo anno la nostra ricerca si è concentrata anche sulla caratterizzazione delle CSCs in linee cellulari e in colture primarie sia di medulloblastoma (MDB) che di glioblastoma (GBM).

Il Glioblastoma multiforme (GBM) è un tumore eterogeneo, altamente proliferativo, normalmente trattato con la chirurgia, seguita dalla radioterapia e la chemioterapia basata su agenti alchilanti. Nonostante ciò la sopravvivenza rimane bassa e recenti scoperte portano a riconsiderare i tradizionali approcci terapeutici (2-4). E' stato inoltre dimostrato che i tumori cerebrali sono caratterizzati da una nicchia ipossica che correla con l'aggressività del tumore (10-12) e che l'ipossia correla con la resistenza alla terapia, suggerendo che una migliore comprensione della nicchia tumorale potrebbe essere essenziale per migliorare le strategie terapeutiche (13).

In questo lavoro abbiamo sfruttato la chirurgia immagine-guidata per cercare di definire differenti aree intra-tumorali per capire se ci fosse una distribuzione delle cellule all'interno del GBM correlata al gradiente di ossigeno.



## Introduzione

Il Glioblastoma multiforme (GBM) è un tumore eterogeneo, altamente proliferativo, classificato come astrocitoma di IV grado. Rappresentano circa il 12-15% di tutti i tumori del cervello e il 60-75% dei tumori astrocitici (1). Questi tumori sono normalmente trattati con la chirurgia, seguita dalla radioterapia e la chemioterapia basata su agenti alchilanti, ma nonostante ciò la sopravvivenza rimane bassa e recenti scoperte portano a riconsiderare i tradizionali approcci terapeutici (2-4). Uno degli agenti alchilanti più usati per il trattamento del GBM è il Temozolomide (TMZ), considerato un farmaco ben tollerato ed efficace. Ma mentre da una parte il TMZ sembra indurre un calo dose- e tempo-dipendente delle cellule staminali tumorali (5), dall'altra alcuni lavori indicano che il TMZ non sembra agire in maniera specifica su questa sottopopolazione (6), che è considerata essere la responsabile della chemio-resistenza all'interno della massa tumorale (2-4,7). Per tale motivo è importante identificare le caratteristiche fenotipiche delle cellule tumorali resistenti e cercare di definire la loro localizzazione nella massa tumorale per cercare di distinguerle dalle altre cellule e poterle colpire con efficienza maggiore. A conferire resistenza al TMZ è una proteina che ripara il DNA, l' MGMT (*O6-methylguanine-DNA-methyltransferase*) che è stata trovata iper-espressa in un sottogruppo di GBMs (8,9) e il cui mRNA è stato trovato maggiormente espresso nella frazione di cellule caratterizzate dall'essere positive per il marcatore di staminalità CD133 (6).

Inoltre è stato dimostrato che i tumori cerebrali sono caratterizzati da una nicchia ipossica che correla con l'aggressività del tumore (10-12) e che l'ipossia correla a sua volta con la resistenza alla terapia, suggerendo che una migliore comprensione della nicchia tumorale potrebbe essere essenziale per migliorare le strategie terapeutiche (13). Inoltre HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$* ) è direttamente implicato sia nella progressione del tumore (14) che nella regolazione di alcune vie importanti nella cellula, quali Notch (15), BMP (*Bone morphogenetic proteins*) (16), Akt/mTOR (17).

Dati recenti suggeriscono che HIF-2 $\alpha$  e alcuni geni regolati da HIF sono preferenzialmente espressi nelle cellule staminali di glioma rispetto alle cellule staminali non tumorali ed ai progenitori neuronali normali (18) e che l'ipossia correla con uno stato di de-differenziazione nel neuroblastoma (12).

Tutte queste informazioni sono a sostegno della ipotesi che il mantenimento della staminalità nel tumore correli fortemente con il gradiente ipossico nella nicchie del tumore stesso.

Normalmente gli studi condotti su biopsie cerebrali considerano il tumore *in toto*. Recentemente però si è parlato di due tipi di cellule staminali tumorali all'interno dello stesso tumore (19). In questo lavoro è stato preso in considerazione il tumore suddiviso in tre regioni, la *core* cioè la parte più interna, la zona intermedia e quella periferica rispetto alla parte centrale e più ipossica del tumore con l'intenzione di verificare se le cellule presenti in queste tre zone fossero fenotipicamente e molecolarmente diverse, in correlazione anche al gradiente di O<sub>2</sub> presente nel *bulk* del tumore.

## **Materiali e Metodi**

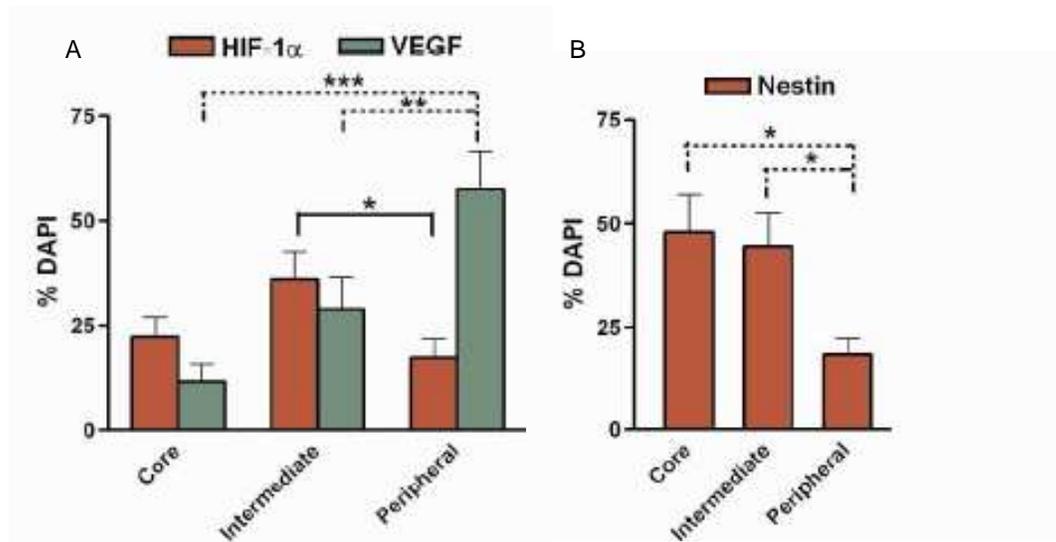
Lo studio è stato condotto su 7 biopsie di GBM divise, in sede di operazione chirurgica, in tre regioni distinte, rispetto alla zona centrale del tumore, e classificate come *core* o zona più interna, zona intermedia e zona periferica. Tramite dissociazione enzimatica delle tre distinte regioni di ciascuna biopsia si sono ottenute le cellule che sono poi state mantenute in coltura al 1,5% di O<sub>2</sub> (16,17). Nel tentativo di caratterizzare dal punto di vista molecolare e fenotipico le cellule di ciascuna zona in correlazione con il gradiente ipossico intra-tumorale e di verificare se rispondessero in modo diverso al trattamento con il TMZ, sono stati eseguiti esperimenti di: 1) analisi della espressione di due marcatori di superficie, il CD133 (marcatore di staminalità) ed il CD24 (marcatore di differenziamento in senso neuronale); 2) analisi della percentuale di cellule in apoptosi tramite test della Annessina-V; 3) analisi del potenziale mitocondriale (20); 4) studio dell'espressione, tramite Western Blot, immunoistochimica ed immunocitochimica, di HIF-1 $\alpha$ , VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), Nestina (marcatore dei precursori multipotenti), GFAP (marcatore specifico degli astrociti e della glia radiale),  $\beta$ III-Tubulina (marcatore delle cellule *committed* e neuronali), Ki67 (marcatore di proliferazione).

## Risultati

### Le cellule staminali tumorali del GBM sono principalmente localizzate nel *core* e nella zona intermedia del tumore

Recentemente è stato riportato che le cellule staminali tumorali rimangono tali in un ambiente ipossico (16,17) che le mantiene in uno stato indifferenziato inibendo l'attivazione delle vie pro-differenzianti come quelle di BMP e di Stat3. Gli studi condotti fino ad ora sul GBM hanno sempre considerato il tumore *in toto*. In questo lavoro sono state raccolte 7 biopsie di GBM ciascuna delle quali suddivisa in tre sub-regioni, il *core*, la zona intermedia e quella periferica sulla base della distanza dalla parte centrale anossica del tumore, nel tentativo di capire le caratteristiche molecolari e fenotipiche delle cellule di ciascuna zona in correlazione con il gradiente ipossico.

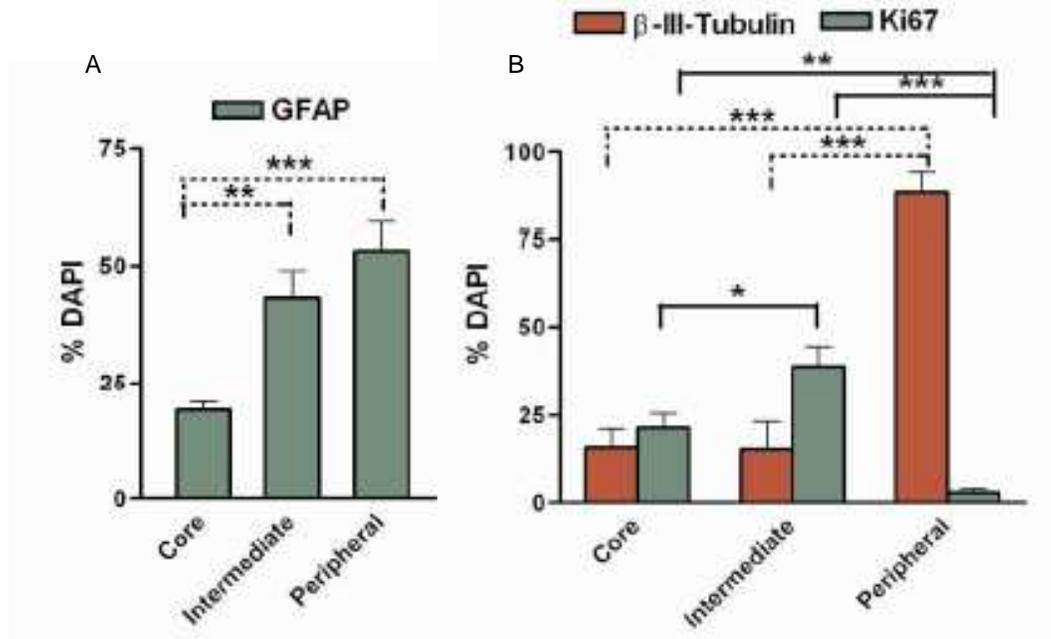
Analisi di immunohistologia hanno rivelato che sia il *core* che la regione intermedia sono caratterizzate da una elevata espressione di HIF-1 $\alpha$  co-espresso con VEGF; anche la zona periferica è caratterizzata da cellule esprimenti VEGF, ma da una bassa espressione di HIF-1 $\alpha$  (Figura 1A). Inoltre sia il *core* che l'area intermedia contengono livelli più elevati di cellule più immature Nestina positive, mentre gli astrociti più *committed* (GFAP positivi) ed i neuroni ( $\beta$ III-Tubulina positivi) sono principalmente distribuiti nell'area periferica (Figura 1B).



**Figura 1:** Differenze fenotipiche delle tre regioni del GBM. Istogrammi che riportano la percentuale di cellule positive per i marcatori HIF-1 $\alpha$  vs. VEGF (A) e Nestina (B) rispetto alle cellule DAPI positive. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Inoltre l'analisi del Ki67, un marcatore delle cellule in proliferazione, mostra che il *core* e l'area intermedia sono caratterizzate da un elevato rate di proliferazione, mentre l'area

periferica da un basso rate di proliferazione (Figura 2B). Sembra quindi che la massa del tumore sia caratterizzata da un *core* anossico costituito da cellule fenotipicamente immature, circondato da un'area ipossica e formata da cellule proliferanti, mentre la zona periferica, più vascolarizzata e presumibilmente più ossigenata, è caratterizzata da cellule più differenziate soprattutto astrogliali esprimenti *signaling* pro-angiogenici.



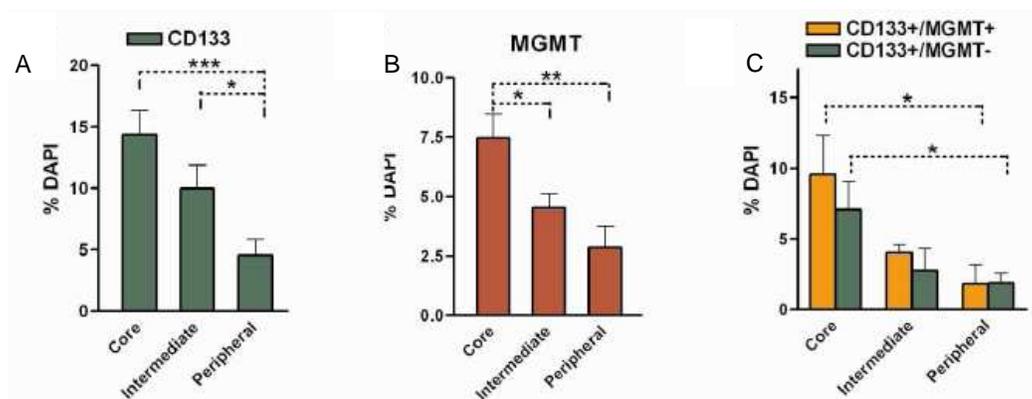
**Figura 2:** Differenze fenotipiche delle tre regioni del GBM. Istogrammi che riportano la percentuale di cellule positive per i marcatori GFAP e  $\beta$ III-Tubulina vs Ki67 rispetto alle cellule DAPI positive. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### Il *signaling* di BMP e di Akt/mTOR risulta essere attivato nell'area periferica del tumore

Nelle cellule di GBM mantenute in ipossia la via pro-gliogenica del BMP (16), come si vede dalla attivazione di Smad1/5/8, e la via di Akt/mTOR e Stat3, molecola a valle di mTOR, correlata al BMP nel promuovere l'astrogliogenesi (21), sono down-regolate, con coinvolgimento diretto di HIF-1 $\alpha$  (17). L'analisi di Smad1/5/8, Akt, mTOR e Stat3 mostra che queste proteine sono fortemente attivate principalmente nella regione periferica del tumore, mentre sono poco valutabili nel *core* e nella regione intermedia. Questo a conferma del fatto che le tre regioni sono diverse dal punto di vista molecolare e questo potrebbe essere il motivo delle differenze fenotipiche.

### La maggior parte delle cellule CD133 positive nel *core* esprimono MGMT

Considerando che l'espressione del marcatore CD133 è correlato anche nel GBM alla staminalità, che le cellule CD133 positive *in vivo* sono in grado di riformare il tumore (2,22-29) e che le cellule staminali all'interno della massa tumorale sembrano essere quelle che riescono a sfuggire alle terapie standard (6,27,28) si è valutata l'espressione del marcatore CD133 nelle tre diverse zone del tumore. In particolare, le cellule CD133 positive sono state trovate soprattutto nel *core* ed anche il MGMT, una proteina che conferisce resistenza agli agenti alchilanti, come il TMZ (8,9), è stata trovata maggiormente espressa in quest'area, mentre è non valutabile nell'area periferica, dove c'è una maggiore presenza di cellule *committed*. In accordo con quanto è stato recentemente dimostrato e cioè che le cellule staminali CD133 positive sono quelle più resistenti alla chemioterapia, anche per gli elevati livelli di espressione di molecole quali MGMT e BCRP1 (6), anche la maggior parte delle cellule CD133 positive presenti in particolare nel *core* del GBM esprimono alti livelli di espressione di MGMT. Si può quindi concludere che la nicchia ipossica tumorale è in grado di preservare le cellule staminali di GBM e può regolare la chemio-resistenza.



**Figura 3:** Le cellule CD133+, presenti principalmente nel *core* del GBM, esprimono MGMT.

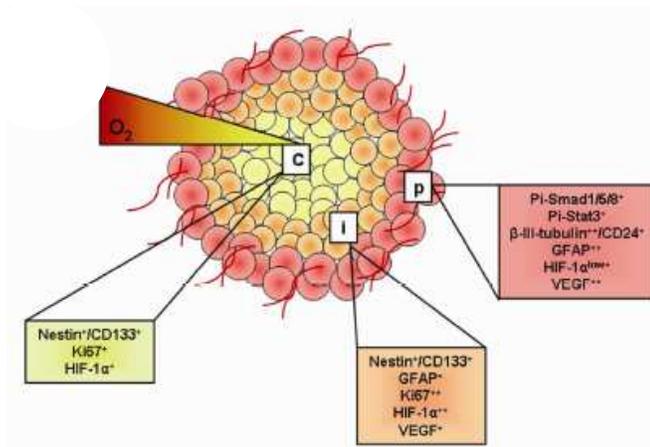
A) Istogrammi relativi alla percentuale di cellule CD133+ B) percentuale di cellule MGMT+ e C) percentuale di cellule CD133+/MGMT+ e CD133+/MGMT- nelle tre regioni rispetto alla percentuale di cellule DAPI positive. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Le cellule della area intermedia tendono, anche dopo dissociazione, a formare neurosfere di grandi dimensioni e ad avere un elevato rate di proliferazione, confermato dalla espressione del Ki67, rispetto alle cellule del *core* e in particolare a quelle dell'area periferica che sono morfologicamente più differenziate e non formano neurosfere. Dal punto di vista fenotipico le cellule del *core* e delle regione intermedia sono caratterizzate da un fenotipo immaturo, mentre l'area periferica contiene una

percentuale più elevata di cellule *committed* a fenotipo CD133-/CD24+ e GFAP+. La tendenza a differenziare delle cellule della regione periferica è confermata anche da un più alto livello della forme attivate di Smad1/5/8, Akt, mTOR e Stat3 e da un aumento della espressione di p21, indice di un arresto del ciclo cellulare e di una induzione del differenziamento. Inoltre i livelli proteici di MGMT appaiono più alti nelle cellule del *core* rispetto alle cellule delle altre regioni. Questi risultati insieme indicano che le tre zone del tumore mantengono la loro identità fenotipica e molecolare anche dopo dissociazione e coltura *in vitro*.

### Le cellule derivate dal *core* e dalla zona intermedia sono resistenti al TMZ

Le cellule maggiormente responsive all'azione del TMZ sono quelle della zona periferica, nelle quali si ha un aumento della apoptosi, dimostrata dall'aumento della percentuale delle cellule Annexina positive. Le cellule del *core* e della zona intermedia, altamente arricchite in cellule staminali, rispondono poco al trattamento con il TMZ. L'induzione della apoptosi è spesso seguita dalla caduta del potenziale mitocondriale, in particolare nelle cellule della zona periferica, a conferma dell'effetto specifico del TMZ sulle cellule di questa regione.



**Figura 4:** Immagine che rappresenta un possibile modello di organizzazione fenotipica e molecolare delle tre aree che formano il GBM. c= core; i= zona intermedia; p= zona periferica

Quindi i primi risultati di questo lavoro dimostrano che l'ipossia intra-tumorale mantiene una "riserva" di cellule CD133 positive, quindi staminali, in un'area precisa della massa tumorale. Inoltre le cellule derivate dal *core* del GBM sono arricchite in cellule staminali, sono caratterizzate da un'elevata espressione di MGMT e sono quindi

quelle più resistenti al TMZ. Viceversa, le cellule ottenute dalla zona più vascolarizzata e differenziata del tumore, la zona periferica, sono quelle più sensibili al TMZ.

## Conclusioni

Nonostante la terapia la sopravvivenza dei pazienti affetti da GBM rimane bassa. L'ipotesi che le cellule staminali siano presenti all'interno della massa del tumore e che siano le responsabili della ricaduta e della resistenza alla terapia post-chirurgica (14), ha modificato l'approccio alla biologia del GBM. Inoltre è diventata sempre più importante nel disegno di nuove terapie, considerare il ruolo che ha l'eterogeneità intra-tumorale all'interno del tumore in toto. Negli ultimi anni, poi, è stato ampiamente studiato il ruolo della nicchia ipossica e l'importanza del gradiente ipossico nel tumore .

Alcune vie del segnale, quali BMP e Akt/mTOR/Stat3 sono inibite nelle cellule di GBM mantenute in ipossia (16,17). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare se queste caratteristiche in qualche modo centrassero con la distribuzione delle cellule staminali nel GBM. I primi dati ci hanno permesso di costruire un modello costituito da tre aree : il *core*, la zona intermedia e la zona periferica. La prima, il *core*, caratterizzata da cellule staminali con un indice di proliferazione basso-medio, l'intermedia, presumibilmente ipossica caratterizzata da cellule tumorali immature e proliferanti e la periferica, più vascolarizzata e caratterizzata da cellule già *committed* o differenziate.

Considerando l'importanza della *signature* ipossica nel mantenimento del pool di cellule staminali che sembrano essere quelle più resistenti alla terapia, abbiamo trovato che la maggior parte delle cellule a fenotipo CD133+ , presenti a livello del *core*, sono caratterizzate da un'elevata espressione di MGMT, l'enzima responsabile della resistenza ai chemioterapici alchilanti (8,9). Inoltre le differenze nella espressione di MGMT osservata nelle tre diverse regioni correla con una diversa sensibilità al TMZ: infatti, le cellule derivanti dal *core* sono più resistenti a questo chemioterapico. Alcuni dati riportano che il TMZ sembra indurre un calo tempo e dose dipendente delle cellule CD133+, riducendo la tumorigenicità *in vivo* (5); altri dicono che il TMZ non fa diminuire le CD133+ (2-4,7). Probabilmente la resistenza al TMZ da parte delle cellule derivanti dal *core* può essere in un certo senso guidata dalla ipossia della parte più interna del tumore. Infatti l'ipossia induce sia direttamente che indirettamente

cambiamenti nella biologia del tumore ed determina una resistenza alla chemio- e radio-terapia (15,33) e la up-regolazione di MGMT può dipendere dalla ipossia.

Il modello di distribuzione concentrica delle cellule di GBM all'interno della massa tumorale (Figura 4) potrebbe avere importanti ripercussioni nel modo di approcciarsi al tumore stesso sia dal punto di vista diagnostico che terapeutico. Infatti a livello di biopsia il chirurgo dovrebbe tenere conto anche della distribuzione delle cellule staminali. Dal momento che le cellule derivate dal *core* sono soprattutto cellule staminali e sono resistenti al TMZ, l'ipotesi è che in sede di operazione chirurgica possano sfuggire dalla porzione eliminata e causare quindi la recidiva. E' da sottolineare che una piccola percentuale di cellule CD133+/MGMT+ è stata trovata anche nella regione periferica del tumore: potrebbero essere proprio delle cellule staminali migranti dal *core* all'area periferica.

## **Bibliografia**

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* Aug 2007;114(2):97-109.
2. Altaner C. Glioblastoma and stem cells. *Neoplasma.* 2008;55(5):369-374.
3. Higa GM, Abraham J. Biological mechanisms of bevacizumab-associated adverse events. *Expert Rev Anticancer Ther.* Jul 2009;9(7):999-1007.
4. Sanchez-Martin M. Brain tumour stem cells: implications for cancer therapy and regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* Sep 2008;3(3):197-207.
5. Beier D, Rohrl S, Pillai DR, et al. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res.* Jul 15 2008;68(14):5706-5715.
6. Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006;5:67.
7. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, et al. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol.* Jun 20 2008;26(18):3015-3024.
8. Chinot OL, Barrie M, Fuentes S, et al. Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. *J Clin Oncol.* Apr 20 2007;25(12):1470-1475.
9. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* Mar 10 2005;352(10):997-1003.
10. Azuma Y, Chou SC, Lininger RA, Murphy BJ, Varia MA, Raleigh JA. Hypoxia and differentiation in squamous cell carcinomas of the uterine cervix: pimonidazole and involucrin. *Clin Cancer Res.* Oct 15 2003;9(13):4944-4952.

11. Helczynska K, Kronblad A, Jogi A, et al. Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer Res.* Apr 1 2003;63(7):1441-1444.
12. Jogi A, Ora I, Nilsson H, et al. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 14 2002;99(10):7021-7026.
13. Amberger-Murphy V. Hypoxia helps glioma to fight therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* May 2009;9(3):381-390.
14. Smith K, Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, Mekhail K, Lee S. Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer. *Cancer Res.* Jun 15 2005;65(12):5221-5230.
15. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell.* Nov 2005;9(5):617-628.
16. Pistollato F, Chen HL, Rood BR, et al. Hypoxia and HIF1alpha repress the differentiative effects of BMPs in high-grade glioma. *Stem Cells.* Jan 2009;27(1):7-17.
17. Pistollato F, Rampazzo E, Abbadì S, et al. Molecular mechanisms of HIF-1alpha modulation induced by oxygen tension and BMP2 in glioblastoma derived cells. *PLoS One.* 2009;4(7):e6206.
18. Li Z, Bao S, Wu Q, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell.* Jun 2 2009;15(6):501-513.
19. Piccirillo SG, Combi R, Cajola L, et al. Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution. *Oncogene.* Apr 16 2009;28(15):1807-1811.
20. Viola G, Salvador A, Vedaldi D, et al. Induction of apoptosis by photoexcited tetracyclic compounds derivatives of benzo[b]thiophenes and pyridines. *J Photochem Photobiol B.* Feb 1 2006;82(2):105-116.
21. Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Taga T. Astrocyte differentiation mediated by LIF in cooperation with BMP2. *FEBS Lett.* Aug 20 1999;457(1):43-46.
22. Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* Oct 1 2004;64(19):7011-7021.
23. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 9 2003;100(25):15178-15183.
24. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* Nov 1 2001;414(6859):105-111.
25. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* Nov 18 2004;432(7015):396-401.
26. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* Dec 16 2004;23(58):9392-9400.
27. Fu J, Liu ZG, Liu XM, et al. Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy. *Chin Med J (Engl).* Jun 5 2009;122(11):1255-1259.
28. McCord AM, Jamal M, Williams ES, Camphausen K, Tofilon PJ. CD133+ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines. *Clin Cancer Res.* Aug 15 2009;15(16):5145-5153.
29. Panchision DM. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol.* Sep 2009;220(3):562-568.



## Parte V

### **IL-23 acts as anti tumour agent on childhood B-acute lymphoblastic leukemia cells**

Claudia Cocco<sup>1</sup>, Chiara Frasson<sup>2</sup>, Emma Di Carlo<sup>3</sup>, Emanuela Ognio<sup>4</sup>, Sara Canale<sup>1</sup>,  
Domenico Ribatti<sup>5</sup>, Ignazia Prigione<sup>6</sup>, Giuseppe Basso<sup>2</sup> and Irma Airoidi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> A.I.R.C. Tumor Immunology Unit, Department of Experimental and Laboratory Medicine, G. Gaslini Institute, Genova, Italy <sup>2</sup> Division of Hematology Oncology, Department of Pediatrics, University of Padova, Italy <sup>3</sup> Department of Oncology and Neurosciences, "G. d'Annunzio" University and Ce.S.I. Aging Research Center, "G. d'Annunzio" University Foundation, Chieti, Italy <sup>4</sup> Animal Model Facility, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italy <sup>5</sup> Department of Human Anatomy and Histology, University of Bari, Bari, Italy

Sottomesso a Blood

---

L'ultima parte di questa tesi, che esula dagli argomenti trattati nelle altre parti, si è focalizzata sullo studio del ruolo che la IL-23 esercita sulle cellule di leucemia linfoblastica acuta-B (LLA-B). Questo studio è stato condotto principalmente nella Unità di Immunologia del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Laboratorio dello Istituto G.Gaslini di Genova. La Leucemia linfoblastica acuta (LLA) è una patologia in cui il blocco della differenziazione, l'iperproliferazione e una apoptosi difettosa risultano in un accumulo aberrante di un clone cellulare. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare l'espressione e la funzione del recettore della IL-23 (IL23R) nelle cellule di leucemia acuta B pediatrica rispetto alla controparte normale e verificare se la IL-23 potesse esercitare una azione anti tumorale diretta sulle cellule di leucemia B e se sì quale fosse il meccanismo coinvolto.



## **Introduzione**

L' IL-23 è una citochina eterodimerica composta da due subunità: IL-12p40 e IL-23p19 (1). L' IL-23, agendo sulle cellule che esprimono il recettore della IL-23 (IL-23R) (2), induce la produzione della citochina pro-infiammatoria IL-17 da parte di una sottopopolazione delle cellule T *helper* CD4+, dette per tale motivo T *helper* 17 (Th17). IL-23R è formato dalla catena IL-12R $\beta$ 1 e dalla catena unica IL-23R, che è a sua volta associata con Jak2 (*Janus activated kinase*) e STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription*) (3). IL-23 è prodotta soprattutto dalle cellule dendritiche (DC) mieloidi attivate dai ligandi dei *Toll-like receptor* (TLR)-2,-4 e -8 (4-6) e dai macrofagi di tipo 1 (7). Questa citochina è considerata importante in molti disordini infiammatori mediati dalle cellule T, quali l'encefalomielite autoimmune (8), le malattie infiammatorie a livello intestinale (9), la psoriasi (10) e le gastriti associate a *Helicobacter pylori* (11). Viceversa l'attività anti-tumorale della IL-23 è ancora controversa.

E' stato dimostrato che le citochine pro-infiammatorie, IL-17, IL-6, e IL-23 possono alterare l'immunosorveglianza mediata dai linfociti CD8 e promuovere la carcinogenesi e la neo-vascularizzazione tumorale (12-16). Altri gruppi hanno dimostrato che l' IL-23 esercita anche un'attività anti-tumorale attraverso la stimolazione delle cellule T e NK (17-24), ma poco si sa sulla diretta attività della IL-23 sulle cellule tumorali.

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA non codificanti con funzione regolatoria implicati nella tumorigenesi (25-30). Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che una espressione ridotta della forma matura del miRNA può promuovere la tumorigenesi (33-34).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare l'espressione e la funzione del recettore della IL-23 nelle cellule di leucemia acuta B pediatrica rispetto alla controparte normale e capire se la IL-23 potesse esercitare una azione anti-tumorale diretta sulle cellule di leucemia B e se si quale fosse il meccanismo coinvolto.

## **Materiali e Metodi**

Lo studio è stato condotto su 29 aspirati midollari di leucemie linfatiche acute pediatriche B (in particolare 4 leucemie pro-B, 19 early pre-B e 6 pre-B) (35) e su 12 controlli normali rappresentati da aspirati midollari di soggetti non affetti da patologie

oncologiche. Le cellule sono state trattate per 6h, 24h e 48h con o senza 100ng/ml di hrIL-23. L'effetto della IL-23 sulle cellule primarie di LLA-B rispetto ai controlli non trattati con la citochina è stato valutato tramite: 1) analisi della proliferazione cellulare; 2) valutazione della apoptosi tramite analisi della espressione della Annessina-V; 3) analisi della espressione di due marcatori: Ki67 (marcatore di proliferazione) e Bcl-2 (marcatore di apoptosi); 4) test di CAM (*chorioallantoic membrane*) per la valutazione del potenziale angiogenico (36)

E' stato estratto l'RNA sia da una linea cellulare B, le 697, che da campioni di LLA-B, trattati e non con 100ng/ml di hrIL-23 ed è stata effettuata un'analisi di espressione dei miRNAs. Inoltre è stata inibita l'attività di un miRNA specifico, il miR-15a, tramite silenziamento, sia nelle 697 che nei campioni di B-ALL.

Sono poi stati condotti esperimenti *in vivo* in topi NOD/SCID inoculati con la linea tumorale 697 pre-trattata con IL-23 o con PBS. Dopo 14 giorni dall'inoculo delle cellule tumorali i topi sono stati sacrificati, è stato misurato il tumore nei due gruppi e su campioni di tessuto fissati sono state fatte analisi di apoptosi, rate di proliferazione delle cellule, conta dei microvasi.

## **Risultati**

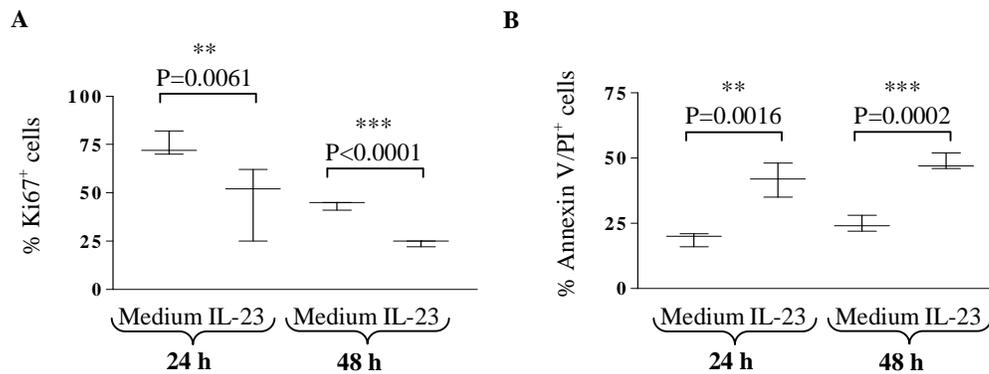
### **Analisi della espressione del IL-23R nelle LLA-B e nella loro controparte normale**

L'analisi della espressione del IL-23R nelle LLA-B e nella controparte normale, ha rivelato che il IL-23R è espresso in maniera costitutiva nelle cellule LLA-B. In particolare nelle pro-LLA-B (percentuale media IL-23R+ 70%, range: 48%-90%), nelle early pre-LLA-B (percentuale media IL-23R+ 66,3%, range: 54%-82%) e nelle pre-LLA-B (percentuale media IL-23R+ 64%, range: 35%-97%). Viceversa, le cellule mononucleate ottenute da midolli normali mostrano una percentuale media di espressione del IL-23R del 1,3% da parte dei linfociti pro-B, del 2,6% da parte dei linfociti early pre-B e del 3,8% da parte dei linfociti pre-B.

### **IL23 induce apoptosi e inibisce la proliferazione delle cellule di LLA-B**

Quindi, nell'intento di capire se l' IL-23 potesse esercitare una azione anti tumorale diretta, le cellule di LLA-B sono state coltivate in presenza/assenza di IL-23 ed è stata valutata la proliferazione dopo 24h e 48h. Ad entrambi i *time points* il trattamento con

IL-23 inibisce la proliferazione delle cellule in modo significativo (24h:  $p<0.006$  e 48h  $p<0.0001$ ) (Figura 1A). Inoltre l'analisi della espressione della Annessina-V, dopo 6h, 24h e 48h ha dimostrato che la percentuale di apoptosi è molto più alta nelle cellule trattate con IL-23 rispetto alle cellule mantenute nel terreno da solo, in modo significativo sia dopo 24h ( $p<0.0016$ ) che dopo 48h ( $p<0.0002$ ) (Figura 1B). IL-23 non induce comunque la produzione di IFN $\gamma$  da parte delle cellule LLA-B e non altera il loro potenziale angiogenico, come valutato dal test di CAM (*Chorionallantoic membrane assay*).



**Figura 1:** Analisi della espressione del Ki67 (A) e della Annessina-V (B) in cellule di LLA-B incubate nel solo terreno o in presenza di IL-23 per 24h e 48h. I risultati rappresentano la percentuale media  $\pm$  SD di 8 diversi campioni\*  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

### IL-23 modula l'espressione dei micro (mi)RNAs nelle cellule B-ALL

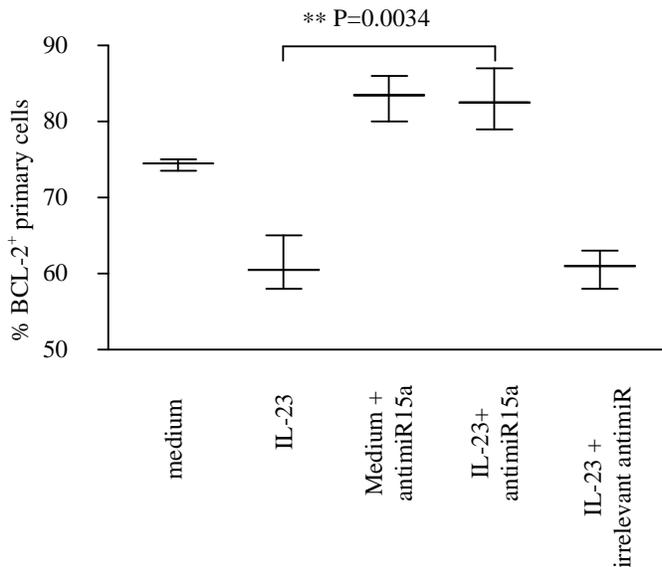
Per capire quale fosse il meccanismo coinvolto nella azione della IL-23, le cellule LLA-B sono state coltivate in presenza/assenza della citochina e sono state testate per valutare se e in quale modo la IL-23 influenzasse l'espressione di alcuni miRNAs, considerando che i miRNAs sono coinvolti nella regolazione della proliferazione e della apoptosi in diversi tumori (25-32).

Nei campioni di LLA-B il trattamento con l'IL-23 down-regola alcuni miRNAs e ne up-regola altri. Tra quelli up-regolati dalla IL-23 ce ne sono alcuni (la famiglia let7 e il miR-15a), che è noto che funzionano da *tumour suppressor* in diverse patologie (29,32,38). L'analisi di ogni singolo miRNA trovato up-regolato nelle LLA-B analizzate ha rivelato che solo il miR-15a è sempre up-regolato in tutti i campioni testati. E' noto che il miR-15a è coinvolto nel controllo della apoptosi e che uno dei suoi target è Bcl-2 (38), una proteina anti-apoptotica. L'analisi di Bcl-2 nelle LLA-B coltivate in presenza/assenza della IL-23 dimostra che Bcl-2 è espresso costitutivamente

nelle cellule di LLA-B, in accordo con dati precedenti (39,40), e che il trattamento con IL-23 riduce significativamente la sua espressione ( $p=0.0017$ ).

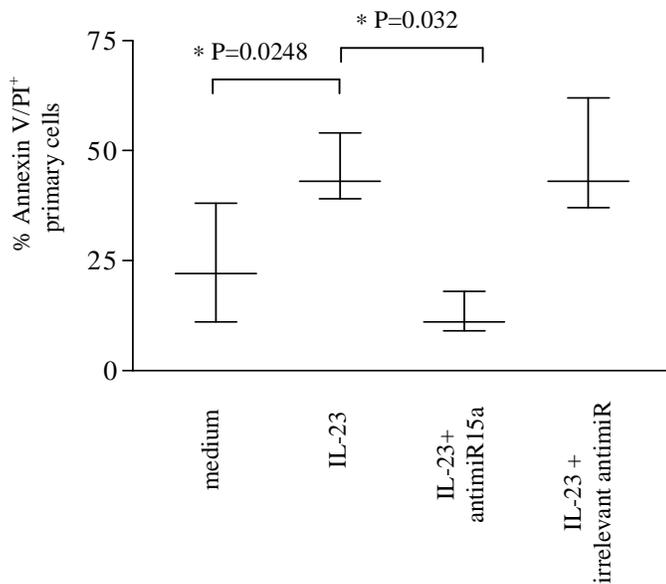
**IL-23 induce apoptosi nelle cellule B-ALL attraverso l'up-regolazione del miR-15a e la conseguente down-regolazione di Bcl-2.**

Quindi, le cellule LLA-B, trattate per 48h con IL-23, transfettate con uno specifico anti miR-15a (per inibire la sua azione) e testate per l'espressione di Bcl-2, mostrano una più alta espressione di Bcl-2 ( $p=0.0034$ ) rispetto alle cellule trattate con la sola IL-23 o con l'IL-23 e transfettate con un anti miR di controllo, a dimostrazione dello stretto legame tra la stimolazione con IL-23, l'up-regolazione di miR-15a e la down-regolazione di Bcl-2 (Figura 2).



**Figura 2:** Espressione intracellulare di Bcl-2 in 5 campioni di LLA-B coltivati per 48h nel solo terreno, in presenza di IL-23, in presenza del anti-miRNA-15a, in presenza di IL-23+ l' anti miRNA-15a o in presenza di IL-23+anti-miRNA di controllo. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

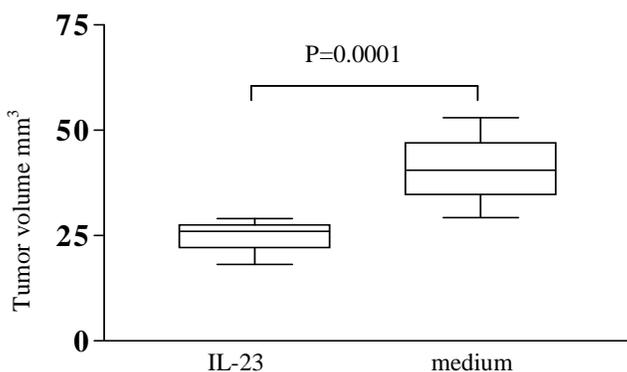
Inoltre, i campioni di LLA-B trattati con la sola IL-23 hanno una percentuale di cellule in apoptosi molto maggiore rispetto alle cellule trattate con la IL-23 e nelle quali il miR-15a è stato inibito ( $p=0.0032$ ) (Figura 3).



**Figura 3:** Percentuale di cellule in apoptosi in 5 campioni di LLA-B coltivati per 48h nel solo terreno, in presenza di IL-23, in presenza di IL-23+ l'anti miRNA-15a o in presenza di IL-23 + un anti-miRNA di controllo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### IL-23 inibisce la tumorigenicità delle 697 in topi NOD/SCID

La linea cellulare B 697 è stata usata come modello per gli studi *in vivo*, per le similitudini con le cellule primarie di LLA-B. Per cui, topi NOD/SCID sono stati inoculati con le 697 pre-trattate con IL-23 o con PBS, come controllo. I topi trattati con IL-23 sviluppano tumori significativamente più piccoli ( $p = 0.0001$ ) rispetto ai topi trattati con PBS (Figura 4).



**Figura 4:** Volume dei tumori formati negli animali sacrificati 14 giorni dopo l'inoculo con la linea cellulare tumorale 697 pre-trattata con IL-23 o con PBS (controllo). Sull'asse delle X sono riportati i due gruppi, mentre sull'asse delle Y i percentili. La differenza volumetrica tra i due tumori è stata valutata con il test di Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## Conclusioni

L' IL-23 appartiene alla famiglia di citochine che comprende anche l'IL-12 che si sa esercitare attività anti-tumorale in patologie ematologiche e non (37,41-43). E' infatti noto che la subunità IL-12R $\beta$ 1, condivisa tra il recettore della IL-12 e quello della IL-23, è espressa sia nelle cellule primarie di LLA-B, in diversi stadi di maturazione, che nella controparte normale (41). In questo lavoro è stato dimostrato che anche l'altra subunità del recettore della IL-23, IL23R, è espressa in modo costitutivo nelle cellule LLA-B e che si ha una più alta espressione nelle cellule leucemiche rispetto alla controparte normale, probabilmente dovuto alla trasformazione maligna. Inoltre, la IL-23 inibisce la proliferazione delle cellule sia *in vitro* che *in vivo* ed induce apoptosi attraverso la modulazione della espressione del miR-15a e di Bcl-2. Poco si sa sulla espressione dei miRNAs nelle leucemie B pediatriche e nessuna informazione è disponibile per quel che riguarda la regolazione dei miRNAs da parte della IL-23. E' noto, però, che ci sono delle strette correlazioni tra l'espressione dei miRNAs e la tumorigenesi (29,33,34) e che la diminuzione della espressione della forma matura del miRNA è stata dimostrata accelerare la trasformazione oncogenica attraverso la deregolazione di oncogeni target (33). Da sottolineare che in questo lavoro si è riscontrata qualche differenza per quel che riguarda i miRNAs regolati dalla IL-23 nelle cellule LLA-B primarie *in vitro* rispetto a quelli regolati dalla citochina nei tumori formati dalla linea cellulare 697 *in vivo*. L'unico miRNA che è up-regolato sia *in vitro* che *in vivo* è il miR-15a, che regola l'espressione di Bcl-2 e promuove l'apoptosi. Quindi l'up-regolazione del miR-15a è un punto chiave della attività anti tumorale diretta esercitata dalla IL-23 sulle cellule LLA-B. I risultati ottenuti per quanto riguarda il recettore della IL-23 dicono che è altamente espresso nelle LLA-B pediatriche e media l'inibizione diretta della crescita tumorale da parte della IL-23. Perciò, l'IL-23, considerando la sua bassa tossicità in modelli animali, anche in relazione alla bassa induzione di IFN- $\gamma$  *in vivo* (20), potrebbe essere un buon farmaco da testare in *trial* di fase I in pazienti affetti da LLA-B che non rispondono alle terapie canoniche.

## Bibliografia

1. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;13:715-725.
2. Annunziato F, Cosmi L, Santarasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007;204:1849-1861.
3. Parham C, Chirica M, Timans J, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol*. 2002;168:5699-5708.
4. Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem*. 2001;276:37692-37699.
5. Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol*. 2005;6:769-776.
6. Carmody RJ, Ruan Q, Liou HC, Chen YH. Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells. *J Immunol*. 2007;178:186-191.
7. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:4560-4565.
8. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421:744-748.
9. Hue S, Ahern P, Buonocore S, et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2006;203:2473-2483.17
10. Kryczek I, Bruce AT, Gudjonsson JE, et al. Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J Immunol*. 2008;181:4733-4741.
11. Caruso R, Pallone F, Monteleone G. Emerging role of IL-23/IL-17 axis in H pylori associated pathology. *World J Gastroenterol*. 2007;13:5547-5551.
12. Langowski JL, Kastelein RA, Oft M. Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumour immune surveillance. *Trends Immunol*. 2007;28:207-212.
13. Langowski JL, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*.2006;442:461-465.
14. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007;117:1175-1183.
15. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol*. 2005;175:6177-6189.
16. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, et al. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res*. 1999;59:3698-3704.
17. Hu J, Yuan X, Belladonna ML, et al. Induction of potent antitumor immunity by intratumoral injection of interleukin 23-transduced dendritic cells. *Cancer Res*. 2006;66:8887-8896.

18. Kaiga T, Sato M, Kaneda H, Iwakura Y, Takayama T, Tahara H. Systemic administration of IL-23 induces potent antitumor immunity primarily mediated through Th1-type response in association with the endogenously expressed IL-12. *J Immunol.* 2007;178:7571-7580.
19. Lo CH, Lee SC, Wu PY, et al. Antitumor and antimetastatic activity of IL-23. *J Immunol.*2003;171:600-607.
20. Oniki S, Nagai H, Horikawa T, et al. Interleukin-23 and interleukin-27 exert quite different antitumor and vaccine effects on poorly immunogenic melanoma. *Cancer Res.* 2006;66:6395-6404.
21. Overwijk WW, de Visser KE, Tirion FH, et al. Immunological and antitumor effects of IL-23 as a cancer vaccine adjuvant. *J Immunol.* 2006;176:5213-5222.
22. Shan BE, Hao JS, Li QX, Tagawa M. Antitumor activity and immune enhancement of murine interleukin-23 expressed in murine colon carcinoma cells. *Cell Mol Immunol.* 2006;3:47-52.
23. Ugai S, Shimozato O, Yu L, et al. Transduction of the IL-21 and IL-23 genes in human pancreatic carcinoma cells produces natural killer cell-dependent and -independent antitumor effects. *Cancer Gene Ther.* 2003;10:771-778.
24. Yuan X, Hu J, Belladonna ML, Black KL, Yu JS. Interleukin-23-expressing bone marrow derived neural stem-like cells exhibit antitumor activity against intracranial glioma. *Cancer Res.*2006;66:2630-2638.
25. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15524-15529.
26. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:11755-11760.
27. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:2999-3004.
28. Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:3627-3632.
29. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;120:635-647.
30. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.*2004;39:167-169.
31. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003;1:882-891.
32. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.*2004;64:3753-3756.
33. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet.* 2007;39:673-677.
34. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435:834-838.
35. Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica.* 2001;86:675-692.

36. Ribatti D, Gualandris A, Bastaki M, et al. New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: the gelatin sponge/chorioallantoicmembrane assay. *J Vasc Res.* 1997;34:455-463.
37. Airoidi I, Di Carlo E, Banelli B, et al. The IL-12Rbeta2 gene functions as a tumor suppressor in human B cell malignancies. *J Clin Invest.* 2004;113:1651-1659.
38. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:13944-13949.
39. Laane E, Panaretakis T, Pokrovskaja K, et al. Dexamethasone-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia involves differential regulation of Bcl-2 family members. *Haematologica.*2007;92:1460-1469.
40. Wang L, Chen L, Benincosa J, Fortney J, Gibson LF. VEGF-induced phosphorylation of Bcl-2 influences B lineage leukemic cell response to apoptotic stimuli. *Leukemia.* 2005;19:344-353.
41. Airoidi I, Cocco C, Di Carlo E, et al. Methylation of the IL-12Rbeta2 gene as novel tumor escape mechanism for pediatric B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res.* 2006;66:3978-3980.
42. Airoidi I, Cocco C, Giuliani N, et al. Constitutive expression of IL-12R beta 2 on human multiple myeloma cells delineates a novel therapeutic target. *Blood.* 2008;112:750-759.
43. Airoidi I, Di Carlo E, Cocco C, et al. Endogenous IL-12 triggers an antiangiogenic programin melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:3996-4001.



## Ringraziamenti

Questa tesi è un po' il riassunto di questi tre anni  
Un lavoro vario e fatto di tante parti diverse tra loro,  
ma anche legate insieme

Tre anni pieni, di cambiamenti, di insegnamenti,  
di momenti belli e di momenti più tristi  
Di giornate lunghe che non finivano mai

Di giornate nate storte  
Di cose dette senza volere  
Di pensieri tenuti dentro  
Di amici vecchi e nuovi

il mio grazie va a tutti voi  
A voi che siete un sorriso in corridoio nelle giornate storte,  
un caffè quando tutto non gira,  
una canzone a volume alto, una risata

e poi grazie al Prof. Giuseppe Basso per aver avuto sempre fiducia in me

grazie a Francesca, Elena, Sara e Luca

grazie ai miei genitori, Alberta e Paolo  
a Michele, Rita e Giovanni  
ad Alvise ed Emanuela  
per esserci sempre

