



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto "Progressi in Biologia e Medicina"

9° Corso di formazione avanzata

**Cellule staminali tumorali:
il vero bersaglio nella cura dei tumori**

19 - 23 aprile 2010, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

9° Corso di formazione avanzata

**Cellule staminali tumorali:
il vero bersaglio nella cura dei tumori**



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

9° Corso di formazione avanzata

**Cellule staminali tumorali:
il vero bersaglio nella cura dei tumori**

19 - 23 aprile 2010, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

© Copyright 2010 

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)
senza il permesso scritto dell'editore.

Indice

Prefazione	pag. IX
------------------	---------

Attualità sui meccanismi dell'oncogenesi

1. Cellule staminali tumorali: complessità biologica e clinica di un paradigma in ematologia/oncologia.....	» 3
<i>Carlo Bernasconi</i>	
2. La trasformazione neoplastica come funzione di staminalità	» 15
<i>CarloAlberto Redi</i>	
3. Intervento di meccanismi epigenetici nella formazione di tumori	» 27
<i>Valeria Santini</i>	
4. Tumori, immunità e microambiente	» 30
<i>Paola Allavena</i>	
5. Leukemic stem cells and the evolution of the concept of the tumor stem cell	» 37
<i>Lucio Luzzatto</i>	

Progressi nelle tecnologie e metodologie

6. DNA-microarray e RT-PCR quantitativa	» 41
<i>Pier Paolo Piccaluga, Maura Rossi, Anna Gazzola, Claudia Mannu, Maria Rosaria Sapienza, Antonella Laginestra, Clara Bertuzzi, Claudio Agostinelli, Maria Teresa Sista, Simona Righi, Carlo Sagramoso, Elena Sabattini, Francesco Bacci, Stefano A. Pileri</i>	
7. Comparative genomic hybridization e single nucleotide polymorphisms su microarray (array CGH, SNP-array)	» 45
<i>Francesco Pasquali</i>	
8. Ruolo della citometria nella caratterizzazione fenotipica e nell'isolamento delle cellule staminali tumorali	» 49
<i>Guido Pagnucco, Massimo Geuna, Giuseppe Carrubba, Francesco Gervasi</i>	

9. Coltura di cellule staminali pluripotenti » 57
*Silvia Garagna, Paola Rebuzzini, Valeria Merico,
 Chiara Vasco, Maurizio Zuccotti, Carlo Alberto Redi*
10. Modelli preclinici basati sull'impiego di cellule staminali » 65
Lucia Ricci-Vitiani
11. Il modello Zebrafish per l'ematopoiesi normale e leucemia » 73
*Michele Malagola, Elisa Alghisi, Cesare Bergonzi, Carla Filì,
 Annalisa Peli, Cristina Skert, Alessandro Turra, Federica Cattina,
 Elisabetta Faucher, Paola Malamani, Domenico Russo*
12. Il ruolo della bioinformatica. Metodi e strumenti
 computazionali per l'integrazione di dati e conoscenza:
 il progetto i2b2 » 79
Riccardo Bellazzi, Daniele Segagni, Alberto Zambelli

Meccanismi delle metastasi

13. Successione dei meccanismi molecolari e cellulari
 della diffusione metastatica » 89
Umberto Magrini
14. The MET oncogene and cancer stem cell invasive growth » 94
Carla Boccaccio
15. Il ruolo del microambiente nello sviluppo dei tumori » 98
Ugo Cavallaro
16. La nicchia vascolare dei tumori come bersaglio terapeutico
 di cellule CD34+ esprimenti TRAIL in combinazione
 con inibitori di AKT » 101
Arianna Giacomini, Carmelo Carlo-Stella

Cellule staminali nelle neoplasie ematologiche

17. La cellula staminale leucemica e il suo microambiente
 nelle LAM » 111
Paolo Bernasconi
18. Cellule staminali leucemiche dormienti nella patogenesi
 della LMC: può il CXCR4 essere un bersaglio
 per la eradicazione della malattia? » 122
Giuliana Alimena
19. La cellula di origine della LLC-B e il supporto
 del microambiente » 130
Marco Gobbi, Marino Clavio

20. Alterazioni genetiche e interazioni con il microambiente nei linfomi maligni » 139
Silvia Rasi, Silvia Franceschetti, Alessio Bruscazzin, Valeria Spina, Riccardo Bruna, Paola Riccomagno, Lorenzo De Paoli, Davide Rossi, Gianluca Gaidano
21. Cellula staminale mielomatosa e microambiente midollare: rilevanza patogenetica nel MM » 145
Antonino Neri, Luigia Lombardi
22. Recidive tardive delle emopatie maligne: come prevenirle? » 153
Carlo Bernasconi

Cellule staminali nei tumori solidi

23. Cellule staminali nel tumore della mammella: dal laboratorio alla pratica clinica » 161
Maria Grazia Daidone, Guido Santilli, Mara Binda, Nadia Zaffaroni
24. Cellule tumorali circolanti nel decorso clinico del tumore della mammella » 168
Maria Teresa Sandri
25. Profilo di espressione genica e predizione della sopravvivenza nel tumore della mammella » 173
Alberto Zambelli
26. Cellule staminali tumorali: nuovi bersagli terapeutici per la cura del cancro » 180
Giorgio Stassi
27. Molecular dissection of the EGFR oncogenic pathway to predict clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer » 185
Salvatore Siena, Andrea Sartore-Bianchi
28. Epigenetics programs in stem-like cells of glioblastoma multiforme » 199
Gaetano Finocchiaro
29. Marcatori molecolari delle cellule staminali tumorali ed implicazioni clinico-terapeutiche » 204
Massimo Aglietta
30. Come il paradigma di cellula staminale tumorale (e sua nicchia) indirizza la strategia terapeutica nella cura dei tumori » 212
Maurizio D'Incalci

Prefazione

Il concetto di cellula staminale tumorale come modello di crescita e progressione neoplastica, lo studio dei segnali di percorso per il *self-renewal* delle cellule staminali, le nuove conoscenze sul microambiente tessutale (nicchia) hanno di recente stimolato la ricerca di terapie antitumorali innovative, in un'area che sino ad ora non era stata focalizzata. Tale area presenta però parecchie complessità biologiche e cliniche, che richiedono un'attenta valutazione. Il corso di formazione avanzata organizzato quest'anno riguarda appunto l'esame e la discussione di queste complessità.

Nella trattazione dei vari argomenti si è seguito il criterio di fornire innanzitutto aggiornate informazioni sui meccanismi dell'oncogenesi, per quanto riguarda sia la trasformazione neoplastica della cellula staminale, sia l'intervento del microambiente. Il progresso delle conoscenze in questi settori di ricerca è stato reso possibile dallo sviluppo di nuove tecnologie e metodologie, che vengono analizzate in dettaglio. Vengono poi esaminate le alterazioni intrinseche alla cellula staminale tumorale e le interazioni cellula staminale-microambiente, che regolano la progressione tumorale sino alla diffusione metastatica.

Le malattie guida nella ricerca oncologica sono sempre state le neoplasie ematologiche. Per tale motivo viene lasciato sufficiente spazio alla descrizione delle caratteristiche biologiche proprie delle cellule staminali leucemiche e di altre emopatie maligne, e alla comprensione dei complessi rapporti che intercorrono fra cellule tumorali e stroma microambientale. Sulla base di queste conoscenze vengono infine trattati alcuni tumori solidi, quali il carcinoma della mammella, del colon-retto e le neoplasie del tessuto nervoso.

I Relatori sui singoli argomenti sono ricercatori particolarmente qualificati, che portano la loro esperienza personale e quella del Laboratorio o Istituto nel quale svolgono la loro attività di ricerca sperimentale o clinica. Calorosamente li ringrazio a nome del Collegio Ghislieri e mio personale.

Carlo Bernasconi

Pavia, 19 aprile 2010

ATTUALITÀ
SUI MECCANISMI DELL'ONCOGENESI

Cellule staminali tumorali: complessità biologica e clinica di un paradigma in ematologia/oncologia

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia.

Consulente ematologo presso l'IRCCS Fondazione "Salvatore Maugeri", Pavia

Pur essendo in origine monoclonali, molti tumori mostrano di essere composti da una popolazione eterogenea di cellule neoplastiche. Questa osservazione è stata tradizionalmente spiegata con la coesistenza di molteplici subcloni cellulari, dovuti ad un'instabilità genetica intratumorale e ad una variabilità di risposta a stimoli esterni provenienti dal microambiente, con progressivo accumulo di mutazioni somatiche. Più recentemente è stata però formulata un'altra interpretazione dell'eterogeneità neoplastica, prospettando che il tumore non sia una semplice espansione monoclonale di cellule trasformate, ma piuttosto un complesso tessuto tridimensionale, in cui le cellule tumorali diventano funzionalmente eterogenee come risultato di una loro differenziazione. Il primo modello di crescita tumorale viene definito stocastico o probabilistico, il secondo è indicato come modello cellula staminale tumorale o modello gerarchico. Le tre caratteristiche peculiari delle cellule staminali sono: il *selfrenewal* (cioè la proprietà di generare per un lungo periodo di tempo cellule uguali alla cellula madre), la capacità di differenziare in molteplici linee cellulari, la potenzialità di proliferare in modo estensivo. Cellule staminali con queste caratteristiche sono state isolate e identificate in diversi tessuti somatici normali, e svolgono un ruolo fondamentale per la loro rigenerazione fisiologica. Il tessuto più dettagliatamente studiato, e sotto questo aspetto meglio conosciuto, è senz'altro il tessuto ematopoietico. Le popolazioni di cellule che derivano dalle cellule staminali sono organizzate in modo gerarchico, secondo una piramide al cui apice sta la cellula staminale, in posizione intermedia sono posti i progenitori progressivamente maturanti lungo le varie linee differenziative e alla base i vari tipi di cellule mature.

È importante ripercorrere le tappe degli studi che hanno portato alla formulazione del paradigma di cellule staminali tumorali (CST), perché la storia del percorso seguito nel raggiungere le nuove conoscenze è senz'altro un aiuto per una loro migliore comprensione e una valida guida per le ricerche future. Queste tappe possono essere così riassunte: caratterizzazione nel topo e nell'uomo delle normali cellule staminali ematopoietiche (CSE), conoscenze ottenute con trapianto di midollo osseo nell'uomo e in altri settori di ricerca, sviluppo di tecnologie e metodologie innovative (quali il cell-sorting di cellule marcate con specifici anticorpi monoclonali e lo xenotrapianto nel topo NOD/SCID gravemente immunodeficiente), identificazione di cellule staminali leucemiche (anche se il termine di

“cellula staminale leucemica” è usato dalla comunità ematologica da parecchi decenni, la prova formale della sua esistenza è stata acquisita solo verso la metà degli anni '90), isolamento e identificazione di CST in tumori solidi (come il cancro della mammella e i tumori cerebrali).

Il paradigma delle CST presenta però parecchie complessità, sia sul piano biologico che sul piano clinico: i risultati sperimentali ottenuti con il test dello xenotrapianto nel topo NOD/SCID non tengono conto dell'intervento del microambiente umano e dei meccanismi di immunosorveglianza; se la mutazione oncogenica fosse anche dedifferenziante, e quindi atta a reindurre un'attività di self-renewal, la cellula di origine di un tumore potrebbe essere oltre che una cellula staminale anche un progenitore; la disseminazione metastatica di un tumore e le recidive tardive comportano l'acquisizione di maggiori conoscenze non solo sulla progressione e accumulo di alterazioni molecolari intrinseche alle CST, ma anche sui rapporti fra le stesse CST e il loro microambiente; le nuove strategie terapeutiche per la cura dei tumori debbono essere mirate all'eradicazione delle CST, e quindi tener conto della loro peculiare citocinetica e dei loro rapporti nella nicchia tessutale.

Sviluppo del concetto di cellula staminale tumorale (CST)

Caratterizzazione nel topo e nell'uomo delle normali cellule staminali ematopoietiche (CSE)

Il sistema ematopoietico è senz'altro il meglio caratterizzato per quanto riguarda l'organizzazione gerarchica e la differenziazione in varie linee cellulari. La moderna era della ricerca sulle cellule staminali inizia negli anni 1960 con i primi esperimenti di trapianto di midollo osseo nel topo panirradiato a dosi letali, che hanno dimostrato l'esistenza nel midollo di precursori clonogenici capaci di una marcata espansione duratura nel tempo e di una differenziazione mielo-eritroide multipotente (Till e McCulloch, 1961). Tutta una serie di studi successivi ha poi consentito l'identificazione fenotipica e funzionale di progenitori e di precursori per distinte linee cellulari. Queste conoscenze hanno portato alla comprensione della biologia delle cellule CSE, fondata su due osservazioni fondamentali:

- 1) nel topo irradiato a dosi letali (con midollo osseo completamente depleto) tutte le linee ematopoietiche possono essere ricostituite con il trapianto di una sottopopolazione cellulare molto piccola (pari allo 0,05% della cellularità midollare totale), caratterizzata sul piano fenotipico dall'assenza di espressione di tutti gli antigeni linea-specifici (Lin-) (Spangrude et al., 1988);
- 2) le cellule capaci di una ricostituzione multilineare possono a loro volta essere suddivise in due gruppi funzionali, di cui il primo è capace di una ricostituzione a lungo termine permanente per tutta la vita (le vere CSE), e il secondo di una ricostituzione transitoria a breve termine che si esaurisce dopo 3-4 mesi (progenitori multipotenti, MPP) (Morrison e Weissman, 1994). È importante sottolineare che, in accordo con un'organizzazione gerarchica, le CSE danno origine alle MPP.

Secondo questo modello la differenziazione procede in due tappe: dapprima la riduzione e perdita della capacità di *self-renewal* (passaggio da CSE a MPP), e

poi la differenziazione progressiva lungo l'intero spettro delle varie linee maturative midollari, sino alla produzione dei diversi tipi di cellule ematiche mature. Il passaggio attraverso i molteplici stadi differenziativi intermedi di progenitori e precursori oligo- e mono-lineari è stato precisato con lo studio del profilo di marcatori fenotipici, lavoro che negli anni ha coinvolto parecchi ricercatori ed è stato sottoposto a continue revisioni (Kiel et al., 2005).

Nell'uomo l'identificazione e la caratterizzazione dei singoli componenti del compartimento staminale ematopoietico è stata ostacolata dalla mancanza di saggi trapiantologici che consentissero la valutazione funzionale *in vivo* di potenziali cellule staminali o progenitrici. Un importante progresso nello studio dell'ematopoiesi umana è stato fatto con lo sviluppo del test quantitativo *in vivo* dello xenotrapianto in topi SCID o NOD/SCID (*severe combined immunodeficient, non-obese diabetic-SCID*) e dei test clonogenici *in vitro* (Dick et al., 1997; Kondo et al., 2003). Oggi è da tutti condiviso che nell'uomo la frazione di cellule CD34+ CD38- Lin- contiene la popolazione di CSE, mentre le frazioni CD38+ e Lin+ contengono progenitori commissionati. All'interno della popolazione CD34+ CD38- Lin-, le vere CSE appaiono particolarmente arricchite nella frazione Thy-1+; infatti, il trapianto di cellule Thy-1+ CD34+ Lin-, raccolte dal sangue periferico dopo mobilitazione, consente di ottenere una ricostituzione ematologica permanente (Shizuru et al., 2005).

Conoscenze ottenute con il trapianto di midollo osseo nell'uomo e in altri settori di ricerca

Mentre venivano gradualmente acquisite le nozioni biologiche sulla caratterizzazione del compartimento delle cellule staminali e progenitori ematopoietici, nuove conoscenze sul concetto di cellule staminali venivano raccolte in altri settori di ricerca. Fra questi il più importante, nell'ambito della ricerca biomedica applicata alla clinica, è stato lo sviluppo del trapianto di midollo osseo per il trattamento della leucemie e di altre gravi malattie ematologiche.

I primi studi sperimentali nel topo e nella cavia, condotti per dimostrare la possibilità di proteggere l'animale panirradiato a dosi letali mediante infusione di midollo osseo, sono dell'inizio degli anni 1950 (Lorenz et al., 1951); ma i vari tentativi di trapianto di midollo allogenico nell'uomo (compreso alcune vittime di un accidente a un reattore nucleare) sono tutti praticamente falliti sin verso la fine degli anni '60. In quegli anni, con poche conoscenze sul sistema di istocompatibilità, molti erano i pessimisti sul fatto che tale trapianto fosse in realtà possibile. Nel 1968 viene però segnalato il primo successo ottenuto in un bambino affetto da grave immunodeficienza combinata sottoposto a trapianto di midollo da donatore fratello presunto HLA-identico (Gatti et al., 1968). Tra il '75 e '77 Donnell Thomas e il suo gruppo di Seattle pubblicano alcuni articoli, in cui riassumono lo stato delle conoscenze di allora sul trapianto allogenico di midollo osseo da fratello HLA-identico in pazienti affetti da anemia aplastica severa o da leucemia acuta, tutti trapiantati dopo fallimento delle terapie convenzionali; la maggioranza sono fallimenti, ma pochi pazienti con leucemia acuta avanzata sopravvivono ancora liberi da malattia alcuni anni dopo il trapianto, e soprattutto

la curva di sopravvivenza presenta un plateau a dimostrazione che una leucemia acuta avanzata può essere curata e guarita (Thomas et al., 1975, 1977). I risultati migliorano nettamente quando, tra la fine degli anni '70 e inizio degli '80, il trapianto viene proposto ed eseguito per la leucemia in prima remissione o all'inizio di una ricaduta. Negli anni '80 il trapianto allogenico di midollo osseo diviene un trattamento universalmente accettato. Inoltre, vengono messe a punto le procedure per raccogliere le cellule staminali/progenitori ematopoietici dal sangue periferico dopo mobilitazione con fattori di crescita. Nel 1990 viene assegnato a Thomas il premio Nobel per la Medicina.

Sono passati circa 40 anni dai primi studi sperimentali sino all'accettazione del trapianto di midollo osseo come procedura clinica routinaria. Pressoché nello stesso periodo di tempo, specie dopo l'acquisizione dei primi risultati clinici, si è andato affermando un nuovo settore di ricerca, quello della biologia molecolare. Questo ha portato alla rapida caratterizzazione di processi biologici, anche con l'uso della genetica; inoltre, ha incentivato lo sviluppo di nuove tecnologie e la produzione di regolatori biologici, anche su scala industriale. Sono state le premesse per la nascita negli anni '80 della biotecnologia industriale, che si è applicata soprattutto alla produzione e commercializzazione dei fattori di crescita ematopoietici. Contemporaneamente, sono state isolate in coltura le cellule staminali embrionali (Evans e Kaufman, 1981) e sono state formulate le prime aspettative di medicina rigenerativa. Per tutti questi motivi le cellule staminali sono diventate alla fine del secolo scorso un argomento di ricerca molto "caldo".

Sviluppo di tecnologie e metodologie innovative

Due importanti progressi tecnologici hanno portato negli ultimi 20 anni ad un rinnovato interesse per gli studi sulle CSE normali e leucemiche. Il primo consiste nello sviluppo della tecnica di cell-sorting di cellule marcate con specifici anticorpi monoclonali (*fluorescence-activated cell sorting, FACS*), e il secondo riguarda la messa a punto della metodica dello xenotrapianto in topi NOD/SCID. Lo sviluppo di FACS ad opera di Herzenberg e del suo gruppo di Stanford (Bonner et al., 1972), combinato con la tecnologia di creare specifici anticorpi monoclonali contro antigeni di differenziazione della superficie cellulare, ha fornito il mezzo per frazionare cellule altamente purificate. Nel topo è stato così possibile distinguere in vivo sottopopolazioni di cellule staminali multipotenti con differenti capacità di ripopolare il midollo (a lungo- o a breve-termine) dopo irradiazione, e di identificare in vitro progenitori/precursori commissionati multi/oligo/monopotenti con test clonogenici in colture cellulari. Il grande sforzo di ricerca fatto per purificare ed identificare nel topo le CSE e la loro progenie ha indicato la via da percorrere per caratterizzare l'ematopoiesi umana.

Poiché gli studi dell'ematopoiesi murina avevano mostrato che le CSE valutate in vivo sono distinte dalle CFU valutate in coltura, e che le CSE con capacità ripopolante a lungo-termine sono distinte da quelle con capacità ripopolante a breve-termine, è risultato evidente che per progredire nella comprensione dell'ematopoiesi umana sarebbe stato necessario disporre di un test di rigenerazione in vivo. L'ostacolo rappresentato da tale necessità è stato superato dallo sviluppo della

procedura di xenotrapianto in topi SCID o NOD/SCID fortemente immunodepressi, che ha fornito la possibilità di utilizzare un test funzionale quantitativo per lo studio di CSE umane, sia normali che leucemiche (Dick, 1996).

Nonostante le differenze del microambiente midollare, lo xenotrapianto in topi NOD/SCID ha dimostrato di essere il miglior test per supplire alla misurazione della capacità ripopolante delle CSE umane. Combinato con test clonogenici, è stato così possibile identificare molti marcatori della superficie cellulare e definire la gerarchia dello sviluppo dell'ematopoiesi umana, ponendo le basi per applicare questi stessi marcatori alla comprensione dell'ematopoiesi leucemica (Dick e Lapidot, 2005).

Identificazione di cellule staminali leucemiche

Anche se il termine di "cellula staminale leucemica" è usato dalla comunità ematologia da parecchi decenni, la prova formale della sua esistenza è stata acquisita solo verso la metà degli anni '90. In quel periodo Dick e il suo gruppo di lavoro iniziarono una serie di ricerche pionieristiche per capire se la gerarchia funzionale osservata nell'ematopoiesi normale fosse presente anche nelle leucemie. Questi studi dimostrarono che in diverse forme di LAM umana (M1, M2, M4, M5) le cellule con capacità di attecchire e moltiplicare nel topo NOD/SCID immunodeficiente erano ristrette ad una piccola parte della popolazione leucemica, caratterizzata dai marcatori di superficie CD34+ CD38-, quindi con lo stesso immunofenotipo dei progenitori multipotenti normali (Bonnet e Dick, 1997). Inoltre, l'analisi della popolazione cellulare leucemica trapiantata nel topo NOD/SCID rivelò la ricostituzione dell'eterogeneità fenotipica osservata nel donatore originale. Questo dato sta ad indicare che le cellule staminali leucemiche (CSL) CD34+ CD38- conservano la capacità differenziativa, dando origine a popolazioni CD38+ e Lin+. Tutte queste osservazioni hanno fornito la prima prova sperimentale che in una malattia tumorale umana (la LAM) le cellule neoplastiche sono organizzate secondo una gerarchia funzionale che rispecchia il sistema delle cellule staminali.

Oltre a fornire la prova iniziale del modello di CST, lo studio della LAM umana ha messo in luce per la prima volta la sua potenziale complessità. Infatti, non tutte le forme di LAM seguono lo stesso paradigma. In pazienti affetti da leucemia acuta promielocitica (LAM-M3) la traslocazione cromosomica t(15:17) è usualmente ritrovata in cellule CD34+ CD38+, e non in cellule CD34+ CD38- (Turhan et al., 1995). I casi di M3 sono piuttosto difficili da giudicare a causa della loro apparente mancanza di capacità di attecchimento nel topo NOD/SCID, e quindi di impossibilità di studio con il test dello xenotrapianto. Tale discrepanza con le altre forme di LAM deve ancora trovare un'attendibile spiegazione.

Isolamento e identificazione di CST in tumori solidi

L'osservazione che parecchi tessuti presentano, come il sangue, la necessità di un continuo rinnovamento (contengono quindi cellule staminali tessuto-specifiche) e le nuove conoscenze sulla biologia delle CSL hanno stimolato una serie di nuovi studi, tendenti a chiarire se il modello delle cellule staminali possa essere applicato anche ai tumori solidi. All'inizio l'attenzione è stata rivolta soprattutto al

cancro della mammella ed ai tumori cerebrali. Per quanto riguarda il cancro della mammella, almeno nella maggioranza dei casi di tumore umano, solo una piccola sottopopolazione del clone tumorale, definita come CD44+ CD24^{-low} e rappresentante l'11-35% della totalità delle cellule tumorali, è dotata della capacità di sostenere la crescita tumorale con il test dello xenotrapianto nel topo NOD/SCID (Al-Hajj et al., 2003). Inoltre, i tumori generati da cellule CD44+ CD24^{-low} hanno mostrato di contenere popolazioni miste di cellule epiteliali tumorali, ricreando l'eterogeneità fenotipica del tumore primitivo. Questo studio ha dimostrato per la prima volta l'esistenza di una gerarchia funzionale, che ricorda il sistema delle cellule staminali, in un tumore solido epiteliale umano. Le scarse conoscenze attuali di biologia delle cellule staminali mammarie umane normali, e dei loro programmi differenziativi, costituiscono un ostacolo alla comprensione della linea e stadio differenziativo di tessuto mammario corrispondenti alla cellula CD44+ CD24^{-low}. Lo sviluppo di colture cellulari per lo studio funzionale di cellule epiteliali mammarie normali e tumorali (test delle "mammosfere") potrà fornire un utile mezzo sperimentale per l'identificazione immunofenotipica dei processi differenziativi dell'epitelio mammario (Ponti et al., 2005).

Il modello delle CST è stato applicato con successo anche ai tumori cerebrali. Infatti, studi condotti in pazienti affetti da glioblastoma multiforme o da medulloblastoma hanno dimostrato che le cellule tumorigene sono ristrette alla sottopopolazione CD133+, che usualmente rappresenta il 5-30% della totalità delle cellule tumorali (Singh et al., 2004). Come previsto dal modello delle CST, i tumori sviluppati dall'iniezione ortotopica intracerebrale di cellule CD133+ nel topo NOD/SCID riproducono l'eterogeneità fenotipica e l'aspetto differenziativo dei tumori primitivi. Nello studio dei tumori cerebrali, la possibilità di disporre di una ben standardizzata metodica di coltura delle cellule staminali neurali normali (test delle "neurosferi"), fornisce un valido strumento per studiare in vitro le loro controparti patologiche (Galli et al., 2004).

Oltre ai tumori della mammella e del cervello, primi risultati interessanti riguardo al modello delle CST sono stati segnalati anche per altre neoplasie, quali il carcinoma della prostata, del colon-retto, del polmone e nel melanoma.

Criteri per definire le CST

Come i corrispondenti tessuti normali, i tumori sono composti da sottopopolazioni cellulari eterogenee, che differiscono per un apparentemente diverso stadio differenziativo. È sulla base di dati morfologici e fenotipici derivanti da tale osservazione, che vengono oggi formulati i referti istopatologici. La stessa osservazione suggerisce che i tumori potrebbero essere interpretati non come semplice espansione monoclonale di cellule mutate, ma piuttosto come tessuti abnormi sostenuti da CST con intrinseca proprietà di *self-renewal* e differenziamento (Clarke e Fuller, 2006). Questa ipotesi è in accordo con il fatto che un tumore è, in molti casi, il risultato dell'accumulo di molteplici mutazioni genetiche in una singola cellula, avvenuto talvolta in un lungo periodo di tempo (sino a parecchi anni). Poiché le cellule staminali sono le uniche cellule che sopravvivono a lungo, sono le candidate naturali per essere le sedi dove le mutazioni trasformanti si possono accumulare.

cellule tumorali progenitrici potrebbe solo generare proliferazioni neoplastiche in breve esauribili (alla pari di quanto si osserva - o meglio si osservava - dopo un trapianto di midollo osseo eseguito con progenitori commissionati e non con cellule staminali ematopoietiche). Questa osservazione consente di interpretare anche il significato che in clinica deve essere assegnato al riscontro di micrometastasi (ossee o linfonodali) al momento della diagnosi di tumori solidi (ad esempio un cancro della mammella). È infatti noto che il numero dei pazienti che durante il decorso hanno poi sviluppato metastasi sul piano clinico, è inferiore a quello atteso in base al riscontro di micrometastasi alla diagnosi. A questa osservazione si riallaccia anche la vecchia nozione, riportata dai patologi molti anni fa, della regressione spontanea delle metastasi che talvolta può seguire l'asportazione del tumore primitivo.

Il modello delle CST fa capire queste inattese osservazioni cliniche. Inoltre, fornisce anche una spiegazione del fatto che, nonostante la grande eterogeneità intratumorale, il raffronto fra campioni analoghi di tumore primitivo e di metastasi (in linfonodi e/o in altre sedi distanti), usualmente fornisce risultati strettamente simili riguardo ad un'ampia serie di parametri non solo morfologici, ma anche immunofenotipici e genetici (Brabletz et al., 2005; Weigelt et al., 2005). Questa osservazione è in contrasto con le previsioni del tradizionale modello stocastico, che considera le metastasi essere originate dall'espansione di subcloni tumorali dotati ciascuno di specifici fenotipi e genotipi, e quindi prospettate essere sostanzialmente differenti dal tumore primitivo. Per contro, considerando il modello gerarchico delle CST, il dato che il tumore primitivo e le metastasi mostrino la stessa eterogeneità fenotipica e genotipica depone per l'origine da cellule staminali uguali, con lo stesso programma differenziativo e lo stesso repertorio di mutazioni genetiche (Dalerba et al., 2007).

Nel decorso della storia naturale di una neoplasia è possibile osservare segni di "evoluzione" genetica della cellula staminale. Il primo studio, che ha dimostrato come popolazioni di CST possano cambiare espressione genica durante la progressione della malattia, è stato condotto in pazienti affetti da leucemia mieloide acuta con traslocazione cromosomica t(8:21) AML1/ETO, che dopo adeguata chemioterapia in grande maggioranza raggiungono remissioni cliniche durature (Miyamoto et al., 2000). Questo studio ha dimostrato che la traslocazione t(8:21) non è sufficiente da sola a indurre leucemia, e suggerisce che le CSL completamente trasformate, sebbene derivate da una cellula staminale ematopoietica Thy-1+ mutata, potrebbero emergere come conseguenza di una mutazione secondaria in un progenitore Thy-1^{neg} più differenziato (Weissman, 2005). Anche in tumori solidi un'evoluzione genetica può accompagnare la progressione della malattia. A tal riguardo di particolare interesse sono i meccanismi che regolano la transizione epiteliale-mesenchimale (*epithelial-mesenchymal transition*, *EMT*), un processo fondamentale che regola la morfogenesi negli organismi multicellulari e che viene riattivato in condizioni patologiche, ivi compresa la progressione e metastatizzazione di carcinomi (Thiery, 2003; Mani et al., 2008).

Una delle caratteristiche delle cellule staminali è anche il basso tasso di ciclo replicativo. Questa osservazione spiega la possibilità del verificarsi di recidive

tumoralmente tardive, dopo il raggiungimento della remissione completa al termine del trattamento primario di una leucemia o di un tumore solido. Ciò può dipendere non solo da caratteristiche intrinseche alla CST dormiente, ma anche dagli stimoli che le giungono dal microambiente tessutale, cioè dalla sua nicchia. A tal riguardo è da sottolineare che il contributo del microambiente ai processi di genesi e progressione leucemica e tumorale è oggi oggetto di un intenso lavoro di ricerca (Ayala et al., 2009), anche per quanto riguarda le opportunità di intervento terapeutico (Lane et al., 2009).

Il paradigma CST ha anche importanti implicazioni per interpretare gli studi di profilo genico tumorale, che hanno dimostrato che l'espressione genica in molti tumori è correlata con il decorso clinico, sul piano prognostico e predittivo. Il profilo molecolare determinato sia dalla cellula di origine del tumore, sia dal profilo differenziativo prodotto dai successivi eventi oncogenici. Di recente con l'analisi di microarray è stato identificato un segnale, la cui espressione è regolata dal gene *Bmi-1* del *self-renewal* staminale, correlato con una cattiva prognosi per 10 differenti tipi di tumore umano (Glinsky et al., 2005). In accordo con questa osservazione, è stato trovato che l'espressione di marcatori di cellule staminali, come *ALDH1* nel cancro della mammella, è un fattore prognostico negativo indipendente. Se l'esame dei segnali molecolari dell'intero tumore può fornire importanti informazioni prognostiche, il profilo genico delle CST purificate potrebbe essere più interessante per definire importanti bersagli terapeutici.

Il modello CST ha portato ad un nuovo obiettivo nella terapia dei tumori: la guarigione può essere raggiunta solo con la completa eliminazione delle CST, mentre i trattamenti chemioterapici attuali, che colpiscono le cellule in fase replicativa, sono piuttosto tesi alla riduzione della massa tumorale. Gli studi per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche debbono quindi affrontare soprattutto due grandi difficoltà:

1. Capire le differenze fra cellule staminali normali e CST, in particolare per quanto riguarda la resistenza ad insulti citotossici e il mantenimento della vitalità in stato di quiescenza. La terapia ideale dovrebbe colpire selettivamente i meccanismi che interessano le sole CST.
2. Utilizzare regimi terapeutici che distruggono le CST indipendentemente dal ciclo cellulare, oppure che inducono selettivamente le CST ad entrare in ciclo.

Complessità biologiche e cliniche

Nell'ultimo decennio al concetto di CST è stata riservata particolare attenzione. Tuttavia, rimangono ancora parecchi argomenti controversi (Rosen e Jordan, 2009) e la serie di complessità, derivate dal nuovo modello di studio della trasformazione e crescita tumorale, suggeriscono che tale formulazione possa essere considerata un'estensione del modello genetico classico, piuttosto che una teoria contraddittoria (Vermeulen et al., 2008).

Le maggiori perplessità derivano dall'osservazione che il modello gerarchico CST è stato formulato soprattutto sulla base di dati sperimentali ottenuti con xenotrapianti nel topo NOD/SCID immunodeficiente, quindi nel contesto di un

microambiente (formato da fibroblasti, adipociti, cellule endoteliali e matrice extracellulare) differente da quello umano e mancante di un intatto sistema immunitario. Così è possibile che una sottopopolazione di cellule, che appare non-tumorigena, possa essere in realtà tumorigena in presenza di un microambiente appropriato. In altre parole, le cellule tumorali potrebbero essere funzionalmente omogenee, con un potenziale eterogeneo che deriva come conseguenza di impulsi estrinseci ricevuti dal microambiente. Nel tentativo di rispondere a tali perplessità, il test classico, che comporta la somministrazione endovenosa delle cellule in esame nel topo NOD/SCID, è stato perfezionato con il test del trapianto ortotopico nel femore; inoltre, sono stati condotti studi utilizzando modelli sperimentali in altri organismi immunodeficienti. I risultati di queste ricerche sono però stati sostanzialmente analoghi a quelli ottenuti con il test classico.

Fattori estrinseci microambientali appaiono soprattutto importanti nei meccanismi di progressione di una neoplasia. In ambito ematologico gli esempi clinici sono numerosi; basti infatti pensare all'intervento del microambiente nella progressione da sindrome mielodisplastica a leucemia mieloide acuta, oppure nel passaggio da MGUS a mieloma multiplo. Questo accade anche nei tumori solidi; un esempio al riguardo è fornito dalla capacità delle cellule tumorali a subire una transizione da epiteliale a mesenchimale (EMT). Recenti studi hanno affermato il concetto che l'espressione di caratteristiche mesenchimali da parte di CST di tumori solidi (quali il cancro della mammella, del colon, del pancreas) si accompagna a maggiore invasività (Mani et al., 2008). Il quesito è capire come l'espressione del processo ETM possa venir regolata nelle CST. Sembra che cambiamenti nel microambiente circostante, che coinvolgono il *transforming growth factor-β* (TGFβ) e altre citochine, influenzino l'espressione di ETM e l'acquisizione di aspetti fenotipici mesenchimali da parte di CST, fenomeno critico per la colonizzazione in sedi distanti dal tumore primitivo (Karnoub et al., 2007). In tal caso la metastatizzazione sarebbe favorita dalla riattivazione in CST di EMT, un processo fondamentale che governa la normale biologia dello sviluppo di un organismo.

Un argomento controverso riguarda la cellula di origine di un tumore. In particolare, se la sede della mutazione tumorigenica debba necessariamente essere una cellula staminale oppure, in casi particolari, possa essere anche un progenitore commissionato. Il quesito è già stato ricordato a proposito della leucemia acuta promielocitica, in cui non è dimostrabile un attecchimento di CSL con il test dello xenotrapianto nel topo NOD/SCID. Le ipotesi che possono venir formulate al riguardo sono che la mutazione tumorale possa indurre in un progenitore anche la funzione di staminalità, oppure che un progenitore mutato possa sostenere anche la proliferazione tumorale. Si tratta di una complessità che deve essere chiarita.

Come è già stato sottolineato, il paradigma CST sta modificando profondamente le strategie terapeutiche antitumorali. Infatti, la terapia citotossica convenzionale riduce la massa tumorale, ma non eradica le CST, rendendo quindi possibile una ricrescita tumorale e a una ricaduta dopo un periodo di tempo più o meno lungo. Al contrario, gli agenti che eliminano selettivamente le CST non inducono una rapida riduzione della massa tumorale, ma le cellule della massa rimasta sono prive della capacità di sostenere la crescita tumorale, e a distanza di tempo il tumore si esauri-

sce. Si rende quindi necessario un riesame delle metodiche usate per valutare l'efficacia clinica delle terapie antitumorali, e delle strategie impiegate durante lo sviluppo preclinico di nuovi farmaci (Wang, 2007). Affrontare e risolvere anche tale difficoltà è indispensabile per lo sviluppo di terapie innovative selettivamente dirette all'eliminazione delle CST, il vero bersaglio per la cura dei tumori.

Bibliografia

1. Al-Hajj M, Whicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Nat Acad Sci.* 2003; 100: 3983.
2. Ayala F, Dewar R, Kieran R, et al. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukaemia progression. *Leukemia.* 2009; 23: 2233.
3. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA, et al. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum.* 1972; 43: 404.
4. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukaemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; 3: 730.
5. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, et al. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumor progression. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 744.
6. Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of Eve. *Cell.* 2006; 124: 1111.
7. Dalerba P, Cho RW, Clarke F. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007; 58: 267.
8. Dick JE. Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. *Semin Immunol.* 1996; 8: 197.
9. Dick JE, Bhatia M, Gan O, et al. Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells.* 1997; 15 (Suppl. 1): 199.
10. Dick JE, Lapidot T. Biology of normal and acute myeloid leukaemia stem cells. *Int J Hematol.* 2005; 82: 398.
11. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292: 154.
12. Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004; 64: 7011.
13. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, et al. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* 1968; 2: 1366.
14. Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest.* 2005; 115: 1503.
15. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007; 449: 557.
16. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005; 121: 1109.
17. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, et al. Biology of hematopoietic stem cells and

- progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol.* 200; 21: 759.
18. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood.* 2009; 114: 1150.
 19. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, et al. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Nat Cancer Ins.* 1951; 12: 197.
 20. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008; 133: 704.
 21. Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukaemia with 8;21 chromosomal translocation. *P.N.A.S. USA.* 2000; 97: 7521.
 22. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolable by phenotype. *Immunity.* 1994; 1: 661.
 23. Ponti D, Costa A, Zaffarano N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005; 65: 5506.
 24. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science.* 2009; 324: 1670.
 25. Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med.* 2005; 56: 509.
 26. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature.* 2004; 432: 396.
 27. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988; 241: 58.
 28. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current Op Cell Biol.* 2003; 15: 740.
 29. Thomas ED, Storb R, Clift RA, et al. Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1975; 292: 832.
 30. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, et al. One hundred patients with acute leukaemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood.* 1977; 49: 511.
 31. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow. *Radiat Res.* 1961; 14: 213.
 32. Turhan AG, Lemoine FM, Debort C, et al. Highly purified primitive hematopoietic stem cells are PML-RARA negative and generate nonclonal progenitors in acute promyelocytic leukaemia. *Blood.* 1995; 85: 2154.
 33. Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, et al. Cancer stem cells - old concepts, new insights. *Cell Death Different.* 2008; 15: 947.
 34. Wang JCY. Evaluating therapeutic efficacy against cancer stem cells: new challenges posed by a new paradigm. *Cell Stem Cell.* 2007; 1: 497.
 35. Weigelt B, Peterse JL, van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 591.
 36. Weissman IL. Stem cell research: paths to cancer therapies and regenerative medicine, 2005.

La trasformazione neoplastica come funzione di staminalità

- Le mutazioni somatiche della trasformazione neoplastica
- La funzione di staminalità può essere acquisita con la mutazione neoplastica?

CarloAlberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università di Pavia,
Direttore Scientifico IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Premessa

Le mutazioni genetiche capaci di aumentare la capacità proliferativa delle cellule hanno ovvi paralleli fenotipici con la trasformazione neoplastica ove le cellule riacquistano la capacità tipica delle cellule embrionali e staminali di proliferare indefinitamente: ora un corpo sempre più sostenuto di evidenze porta alla formulazione del concetto di “cellule staminali cancerose” (CSC). In altre parole, una serie di chiarissime evidenze porta oggi a sostenere il concetto che il tumore contenga delle sue proprie cellule staminali. Come ricordato infatti le cellule del tumore, come le cellule staminali, possono proliferare indefinitamente grazie alla deregolazione della capacità di rinnovo cellulare. Non è questa la sola caratteristica in comune tra i due tipi di cellule: sia le cellule neoplastiche che le staminali embrionali hanno la capacità di produrre teratomi quando iniettate in topi gravemente immunodeficienti. Si è venuta così delineando la possibilità di sviluppare un nuovo concetto alla base della più moderna visione del cancro, quello dell’esistenza delle CSC, concetto con il quale si sostiene che le tipiche proprietà della cellula staminale (staminalità = rinnovo, proliferazione, differenziamento) sono condivise dalle cellule cancerose e sono cruciali per l’iniziazione e il mantenimento del tumore e delle sue metastasi. Questo concetto, originalmente proposto da John Cairns nel 1975, è oggi ritenuto fortemente valido nell’ambito delle patologie leucemiche e per una varietà di tumori solidi.

E dunque, i dati più attuali tendono a favorire una risposta positiva al corretto quesito (scolastico) posto da uno dei sottotitoli della presente relazione: e ciò per il fatto che si sta consolidando la concezione paradigmatica della trasformazione neoplastica come guadagno della funzione di staminalità da parte di cellule differenziantesi o terminalmente differenziate. Alla luce degli avanzamenti delle conoscenze di questi ultimi pochi anni è infatti divenuto sempre più chiaro il lega-

me concettuale che lega il fenotipo neoplastico a quello di staminalità. La prova più chiara a sostegno di questo concetto è fornita dalla riprogrammazione genetica delle cellule terminalmente differenziate, riprogrammazione che porta ad acquisire il fenotipo tipico della pluripotenza grazie alla sovraespressione esogena di quattro geni (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4): fenomeno noto come induzione di pluripotenza, capace di portare alla formazione di quelle che sono note come cellule staminali iPS (*induced Pluripotent Stem cells*, Takahashi e Yamanaka, 2006). Tra i quattro geni originalmente impiegati ben due sono oncogeni (c-Myc e Klf4). A sostenere questa visione vi è poi il dato di Kawamura e collaboratori (Kawamura et al., 2009) sulla alta efficienza dei processi di riprogrammazione genetica quando si sopprime la attività della proteina tumore-soppressiva p53.

Introduzione

L'accadere di mutazioni in uno o più geni è alla base del cancro che viene dunque a definirsi come una malattia genetica (Hanahan e Weinberg, 2000). Durante la vita di un individuo la maggior parte delle mutazioni si sviluppa (pare) casualmente a carico di una del milione di miliardi (10^{15}) di cellule che compongono il corpo umano. Quando le mutazioni colpiscono i geni la cui funzione consiste nel controllo della proliferazione cellulare, le cellule si possono riprodurre in maniera continua, diffondersi ovunque nel corpo ed infiltrare i tessuti acquisendo così le caratteristiche di un tumore maligno. I tumori che si originano in tal modo sono detti "tumori sporadici" mentre quelli che insorgono nelle cellule germinali (circa il 5-7% dei tumori), e che quindi possono essere trasmessi alle generazioni successive, sono detti tumori ereditari. L'avanzamento delle conoscenze nella genetica molecolare consente oggi di identificare i principali geni coinvolti in alcuni dei tumori ereditari. Il tasso di mutazione misura la frequenza con cui una mutazione si origina ex novo in un'unità di tempo biologico (di solito una generazione). Nell'uomo il tasso di mutazione è stato stimato essere di circa una nuova mutazione ogni 7 divisioni cellulari. La frequenza della mutazione è per definizione la frequenza con la quale una data mutazione viene osservata in una popolazione. Alle mutazioni conseguono degli effetti biologici che possono avere dei riscontri sia su una scala temporale longitudinale, una scala temporale di tipo evolutivo (giocare cioè un ruolo nel cambiare le frequenze genotipiche nel tempo evolutivo), sia su una scala temporale trasversale, immediatamente riscontrandone gli effetti sul soma del portatore. Queste mutazioni sono di due tipi e vengono dette mutazioni precoci e somatiche. Le mutazioni precoci determinano i loro effetti specifici in settori del corpo tanto più ampi quanto più precoce è la loro insorgenza (sono una delle cause del mosaicism) mentre le mutazioni somatiche sono associate al rischio di sviluppare il cancro. Detto in altre parole ed impiegando altri termini, le mutazioni somatiche sono molto frequenti nell'uomo. I tassi di mutazione variano da 10^{-5} a 10^{-7} per gene per generazione e poiché, come sopra ricordato, il nostro corpo è costituito da circa 10^{15} cellule ne consegue che ciascuno di noi è un mosaico somatico per innumerevoli mutazioni (potenziali malattie) genetiche. In realtà solo se una mutazione somatica produce un clone

consistente di cellule mutanti si può originare un rischio per l'intero organismo e cioè quando la mutazione causa l'anomala proliferazione di una cellula, che normalmente si replicherebbe poco o nulla, generando così un clone di cellule mutanti. Come già ricordato in premessa, il cancro viene indotto dalle mutazioni che compromettono il regolare funzionamento di geni connessi al controllo della proliferazione cellulare. Diversi sono i meccanismi molecolari capaci di alterare il regolare funzionamento genico, dalla espressione ex novo di nuovi alleli dovuti alla mutazione genica sino alla alterazione del dosaggio genico dovuta a mutazioni a carico di (interi o) porzioni di cromosomi passando per le variazioni del numero di copie (CNVs, *Copy Number Variations*) di porzioni ripetute del genoma (non necessariamente di geni; le CNVs sono variazioni genetiche universali e la loro associazione con diverse e tante patologie è ormai riconosciuta senza dubbi e saranno trattate in altra parte del volume). Le mutazioni somatiche si verificano a carico del DNA di singole cellule e l'alterazione genetica è riscontrabile solo nelle cellule derivate dalla cellula mutata (nel caso di tumori, pertanto, solo nelle cellule neoplastiche del paziente). Le mutazioni germinali, invece, che stanno alla base dei tumori ereditari, sono rinvenibili in tutte le cellule del corpo poiché originariamente presenti nelle cellule germinali (uovo o spermatozoo) dalle quali derivano, appunto, tutte le cellule dell'organismo. È chiaro che la mutazione insorta in una cellula germinale può comunque esplicitare il suo danno sull'individuo portatore senza che sia obbligatoriamente in grado di passare alla generazione successiva (il portatore non si riproduce o si riproduce ma il gamete che contribuisce non porta alcuna mutazione).

Proto-oncogeni, oncogeni e geni oncosoppressori

Sono stati identificati parecchi geni, detti proto-oncogeni, che attraverso un processo di mutazione possono causare il cancro trasformandosi in oncogeni (geni induttori di tumori). I proto-oncogeni partecipano al controllo della divisione cellulare e della proliferazione delle cellule stesse. La proliferazione cellulare è regolata in ogni tipo di cellula da diversi meccanismi molecolari e da diverse sostanze (fattori di crescita, cicline, ecc.): i proto-oncogeni sono geni coinvolti nella produzione dei fattori di crescita o nella specificazione dei loro recettori. La loro mutazione può far sviluppare un eccesso di fattori di crescita e determinare di conseguenza una crescita incontrollata. A loro volta le mutazioni dei recettori possono causare errori nella ricezione dello stimolo ormonale del fattore di crescita. Le proteine dei proto-oncogeni sono componenti della circuiteria che trasporta uno stimolo alla crescita dalla membrana cellulare fino al nucleo, attraverso una complessa cascata di segnali. Tipicamente, un fattore di crescita si lega ad un recettore sulla membrana di un determinato tipo cellulare; questo legame determina a sua volta una attivazione di proteine che, in un processo a cascata, a loro volta attivano dei fattori di trascrizione, proteine che entrano nel nucleo attivano dei geni i cui prodotti sono necessari per la divisione cellulare. Una mutazione in un proto-oncogene può portare di conseguenza alla produzione di una versione alterata o di una eccessiva quantità di una di queste proteine. Il risultato

netto di un simile evento sarà l'accelerazione dei processi della circuiteria brevemente descritta e quindi la crescita e la divisione incontrollata della cellula.

Gli oncogeni (proto-oncogeni attivati) possono dunque essere suddivisi in cinque classi principali:

1. fattori di crescita secreti (ad esempio SIS);
2. recettori sulla superficie cellulare (ad esempio ERBB, FMS);
3. componenti di sistemi intracellulari di traduzione del segnale (ad esempio la famiglia RAS, ABL);
4. proteine nucleari che si legano al DNA, compresi i fattori di trascrizione (ad esempio MYC);
5. componenti del circuito delle cicline, chinasi ciclina-dipendenti e inibitori delle chinasi che governano la progressione del ciclo cellulare.

Un chiaro riferimento al ruolo ora descritto degli oncogeni nella trasformazione neoplastica su base staminale è stato di recente fornito da Perez-Caro et al. (2009) i quali hanno dimostrato chiaramente il ruolo della mutata attività di un oncogene nella genesi neoplastica mettendo in luce la attività dell'oncogene BCR-ABLp210 (associato con la leucemia mieloide cronica nell'uomo) nel solo comparto staminale in un modello murino transgenico.

Nelle cellule sono poi presenti dei geni detti oncosoppressori i cui prodotti hanno il compito di rallentare la crescita e la divisione cellulare (Wu et al., 2010). L'assenza, o la mancanza di funzionalità, di queste ultime proteine avrà la conseguenza di accelerare la progressione cellulare. Poiché in ogni cellula ci sono due copie di ogni gene, è necessaria la mutazione o l'inattivazione di tutte e due le copie perché la cellula divenga cancerosa. La proteina più nota a funzione oncosoppressore è la proteina p53, capace di rallentare la crescita cellulare quando la cellula è mutata, così che si attivino i geni del riparo del DNA, o di attivare delle vie apoptotiche quando il danno al DNA è troppo esteso. Quando la sua funzione è compromessa (per mutazioni nonsense, ad esempio) viene espressa una proteina con mutazioni puntiformi che ha perso le proprietà oncosoppressive tipiche della forma selvatica e ne ha acquisite di altre (per guadagno di funzione) capaci di promuovere la trasformazione neoplastica e la invasione metastatica. Nell'esplicare queste nuove funzioni la p53 mutata altera anche il traffico delle integrine e dei recettori per il fattore di crescita epidermico (EGFR). Queste nuove conoscenze aprono anche uno spiraglio verso lo sviluppo di molecole ad attività farmacologicamente attive per il blocco dei recettori dell'EGF e delle integrine con il quale ottenere degli effetti terapeutici positivi (Muller et al., 2009).

Da quanto ricordato è evidente il ruolo giocato nella trasformazione neoplastica da un'altra categoria di geni, quelli i cui prodotti sono capaci di riparare il danno al DNA. Se mutano i geni del riparo le mutazioni possono accumularsi nella cellula e portare allo sviluppo del cancro proprio per l'accumulo di mutazioni che interessano oncogeni, geni soppressori di tumori e geni del riparo. È chiaro che dalla moltiplicazione delle cellule somatiche nelle quali è avvenuta una mutazione si originano cellule figlie portatrici di quella mutazione. In più, in alcune di queste può avvenire una seconda e poi successive mutazioni, che alla fine produ-

cono cellule tumorali. E dunque il cancro è una malattia genetica poiché alla base del suo sviluppo vi è una modificata informazione genetica portata da una cellula. Questo significa che la maggior parte dei tumori non è ereditaria. Alcune volte però un individuo eredita dai suoi genitori un gene mutato, per esempio un oncosoppressore (mentre l'altra copia è normale). È quindi più probabile per quest'individuo sviluppare un tumore, perché basterà una sola mutazione nella seconda copia del gene, in una delle sue cellule somatiche, per produrre una cellula che comincerà a riprodursi in maniera anomala. Le mutazioni puntiformi rappresentano un meccanismo genetico di attivazione dei proto-oncogeni capaci di esercitare una regolazione positiva sul ciclo cellulare, si ricordino ad esempio due oncogeni KRAS e BRAF, noti per l'elevata frequenza con cui si associano a mutazioni hot-spot nei tumori del colon-retto. L'effetto fenotipico della mutazione è rappresentato da una proteina mutata con un'aumentata attività, per lo più svincolata dai fisiologici meccanismi di regolazione. Nei tumori sporadici le mutazioni sono eventi somatici che favoriscono lo sviluppo di un clone cellulare ad aumentata attività proliferativa. Lo studio di queste mutazioni può essere rilevante nella diagnostica dei tumori e nello studio delle diverse vie della carcinogenesi. L'esempio ormai classico al riguardo è quello del gene BRCA-1 per il carcinoma mammario e dell'ovario (clonato da Mark Skolnick dell'Università dello Utah di Salt Lake City). La proteina di BRCA-1 svolge un ruolo chiave nel governare la stabilità del genoma nel corso della replicazione e espressione genica, fondamentalmente attraverso il suo coinvolgimento nel controllo di alcuni passaggi chiave del ciclo cellulare (cell cycle checkpoint control) e nella supervisione dei meccanismi di riparo del DNA. La funzione oncosoppressoria è dovuta proprio a questa duplice veste di governo, da un lato, e di esecuzione di processi del riparo del danno al DNA (Huen et al., 2010). Oggi si è vicini anche al chiarimento delle basi genetiche del melanoma maligno. E questa patologia si presta bene alla presentazione paradigmatica delle CSC. È oggi chiaro il legame tra il melanoma e le mutazioni a carico di un gene che codifica per p16, una proteina inibitrice della chinasi ciclica (David et al., 2010). Il melanoma maligno, un tumore la cui incidenza negli ultimi decenni è aumentata più rapidamente rispetto ad ogni altro tipo di tumore, colpisce nell'8/12% dei casi individui con predisposizione genetica. Nelle famiglie colpite, la predisposizione è associata ad un carattere autosomico dominante MLM, caratterizzato da penetranza incompleta e espressione variabile. Finora i genetisti hanno individuato due loci per il melanoma situati sui bracci corti dei cromosomi 9 e 1. Per quanto riguarda il locus sul cromosoma 9p l'individuazione del singolo gene responsabile del carattere MLM non sembra lontana. Circa due anni fa l'MLM era infatti stato mappato sul cromosoma 9 in posizione p21 e lo studio della sua modalità di trasmissione ereditaria in famiglie con predisposizione verso il melanoma, aveva portato alla formulazione dell'ipotesi che si trattasse di un gene oncosoppressore in grado di indurre tumori secondo il modello originariamente proposto da Knudson per il retinoblastoma e successivamente verificato per altri geni oncosoppressori come per esempio p53. Il modello di Knudson vede il cancro come una malattia legata ad un carattere recessivo e si basa su alcune osservazioni sperimentali tra cui la possibilità di sop-

primere il fenotipo maligno trasfettando geni *wild type* nelle cellule tumorali. Secondo l'ipotesi di Knudson, come già illustrato in precedenza, nelle cellule normali specifici geni dominanti sono deputati al controllo della proliferazione. Se sia l'allele paterno che quello materno di uno di questi geni risulta mutato, il controllo della proliferazione viene perso e si esprime il fenotipo trasformato. Nelle forme tumorali su base ereditaria è presente un allele mutato nelle cellule della linea germinale. La mutazione (recessiva) viene così trasmessa alla prole e basta a questo punto una seconda mutazione somatica o una perdita allelica a carico dell'allele normale perché venga espresso il gene mutato, con la conseguente perdita del controllo della proliferazione e l'espressione del fenotipo trasformato. Nelle forme sporadiche entrambe le mutazioni sarebbero invece somatiche. Perciò anche nel caso dell'MLM, si pensa che l'acquisizione ereditaria di un allele mutato predisponga verso il melanoma mentre una seconda mutazione somatica nel secondo allele porta allo sviluppo del tumore maligno. In accordo con quanto predetto nell'ipotesi sono state osservate frequenti mutazioni a carico del cromosoma 9p21 sia in cellule tumorali che in linee cellulari. Inoltre ben il 60% delle linee cellulari di melanoma maligno presenta alterazioni omozigoti in questa zona il che fa ritenere che nel locus MLM sia presente un gene oncosoppressore denominato CDKN2. Questo gene codifica per una proteina, p16, in grado di regolare la chinasi ciclina-dipendente (CDK). La p16 si lega alla CDK4 impedendole di interagire con la ciclina D che a sua volta non risulta più in grado di promuovere il passaggio attraverso la fase G1 del ciclo cellulare: la p16, che agisce impedendo alle cellule di proliferare, rappresenta un potenziale gene oncosoppressore. Quindi sia per la funzione cellulare, sia per la posizione in 9p21, il gene CDKN2 è il candidato ideale per il carattere MLM. La prova definitiva del coinvolgimento di questo gene nella predisposizione verso il melanoma maligno richiede però che siano soddisfatte una serie di condizioni. Deve infatti essere inconfontabilmente dimostrata la perdita nei tumori dell'allele normale e la ritenzione dell'allele mutato; inoltre è necessario verificare se la reintroduzione dell'allele normale nelle cellule tumorali sia in grado di revertire il fenotipo trasformato. Degli individui portatori di mutazioni solo il 30% non presenta segni di melanoma maligno e si tratta, nella maggior parte dei casi, di soggetti giovanili che non hanno ancora raggiunto l'età media per l'esordio della malattia. Sebbene questi risultati non rappresentino una prova definitiva della necessità di eventi di mutazioni e delezioni a carico del gene per la p16 per lo sviluppo del melanoma nelle famiglie predisposte, sostengono però il ruolo di CDKN2 come uno dei geni responsabili delle forme ereditarie di melanoma maligno.

Mutazioni, staminalità e trasformazione neoplastica

È del 1975 la ipotesi più accreditata che lega questi tre fatti ed è stata formulata da John Cairns, all'epoca all'Imperial Cancer di Londra (Cairns, 1975) e successivamente rielaborata in alcuni dettagli di minima dallo stesso Cairns con il suo passaggio al "Clinical Trial Service Unit" dell'Università di Oxford (Cairns, 2002; 2006). In sintesi, Cairns ipotizza che la staminalità (ne parlava già nel

1975!) sia funzionalmente spiegabile con il fatto che dopo la replicazione mitotica del DNA la segregazione del filamento stampo e di quello neosintetizzato non sia casuale ma tutti i vecchi filamenti (quelli che sono stati impiegati come stampo) siano continuamente mantenuti, segregati, in una sola cellula. Questa cellula figlia diviene staminale mentre l'altra cellula (destinata a differenziarsi) derivante dalla divisione mitotica eredita tutti i filamenti neosintetizzati, i quali pure segregano tutti insieme e vengono sempre ereditati dalla cellula figlia *committed* alla differenziazione. Così accadendo, il carico di mutazioni resta inalterato (minimo) per la cellula che eredita il filamento stampo "vecchio" mentre nei filamenti neosintetizzati si vanno accumulando le mutazioni (circa una ogni sette divisioni mitotiche) che periodicamente si manifestano ad ogni ciclo di replicazione. Si può così giungere ad uno stato infiammatorio intermedio che prelude, continuando il processo di accumulo delle mutazioni, alla comparsa di cellule neoplastiche una volta che il carico di mutazioni abbia superato una soglia critica capace di compromettere la attività genica dei geni onco-soppressori (Cairns, 2006; Rando 2007) promuovendo quella dei geni deputati alla proliferazione cellulare.

Cellule staminali cancerose, CSC

Lo studio dei marcatori di superficie che caratterizzano le cellule staminali e quelli delle cellule neoplastiche in vari tipi di tumori ha portato dunque a ribadire un concetto assai datato, quello dell'esistenza delle cellule staminali del tumore (Reya et al., 2001). A questo proposito il lettore deve riferirsi ad un documento prodotto e pubblicato dall'*European Molecular Biology Organization* (EMBO), del 2006, che tratta in modo completo ed esaustivo il tema. La pubblicazione ha per titolo: "La ricerca sulle cellule staminali: risultati, prospettive, prerequisiti" ed è scaricabile gratuitamente all'indirizzo: <http://www.embo.org/index.php>.

Tra i tanti capitoli di interesse, tutti trattati dai massimi esperti capaci di dare una panoramica generale sulla natura delle cellule staminali e sul loro differenziamento in specifiche tipologie cellulari oltre che delle raccomandazioni sull'uso delle staminali in terapia, vi è un capitolo dedicato alle CSC trattato da quello che è forse il maggior esperto a livello internazionale del tema, il prof. Riccardo Fodde (laureatosi a Pavia) dell'Università di Leiden (Fodde, 2006; Gaspar e Fodde, 2004). Qui di seguito viene riportata la traduzione del capitolo del prof. Fodde (con alcune modificazioni: il lettore è invitato a riferirsi all'originale per una trattazione ben più completa) che inizia presentando le cellule staminali normali così come sono comunemente definite: caratterizzate dalle capacità di automantenersi (attraverso la duplicazione cellulare) e di acquisire ed esercitare alcune funzioni (attraverso il differenziamento). L'automantenimento e il differenziamento sono relativi alla capacità delle cellule staminali di dividersi in modo asimmetrico, cioè ad ogni divisione cellulare si producono sia cellule pluripotenti (del tipo staminale) che commissionate (differenziate o specializzate) in un modo finemente regolato. Al contrario della loro controparte embrionale, le cellule staminali somatiche esistono, anche se sono poche, in tutti gli organi dell'organismo

e giocano un ruolo essenziale nel preservare e mantenere i tessuti nell'adulto. Inoltre, specifiche nicchie di cellule staminali possono essere espanse (per esempio, le ghiandole mammarie durante la gravidanza) o reclutate per riparare danni tessutali (per esempio, durante una ferita). All'interno di queste nicchie di cellule staminali, è molto importante l'automantenimento e il differenziamento, ma anche la migrazione cellulare e la morte cellulare programmata, che devono essere mantenuti in stretto equilibrio per evitare la perdita di massa cellulare (perdita di tessuto dovuta a più differenziamento che automantenimento) o l'aumento (crescita del tessuto o neoplasia, dovuta a più automantenimento che differenziamento). Le CSC derivano probabilmente dalla loro controparte normale attraverso mutazioni che alterano le vie di trasduzione del segnale nelle cellule (esempio, le vie di Wnt, Hedgehog e Notch), note per regolare finemente questo bilancio. Questo può essere dovuto, per esempio, ad un semplice sbilanciamento della divisione cellulare da simmetrica verso asimmetrica o all'insensibilità ai segnali di crescita inibitori rilasciati dalle cellule circostanti. In accordo con il modello CSC, una piccola sottopopolazione di cellule mantiene le proprietà di cellule staminali ed è responsabile della crescita tumorale (per automantenimento) e dell'eterogeneità (per differenziamento). Sono state ottenute evidenze sperimentali per l'esistenza delle CSC in diversi tipi tumorali, quali leucemia, mieloma multiplo, tumore della mammella, tumore del cervello (Galderisi et al., 2006), alla prostata e al polmone, come indicato nella Tabella 1.

L'ipotesi delle CSC rappresenta oggi un concetto molto innovativo nella biologia del cancro con profonde e fondamentali implicazioni per la clinica. La ricerca sulle CSC si muoverà in parallelo con quella sulle normali cellule staminali embrionali e somatiche. Le CSC sono identificate in base alla loro capacità di replicare la tumorigenesi anche se trapiantate in basso numero nei modelli sperimentali. Per esempio, una cellula su 105 cellule della leucemia mieloide acuta esprime il marcatore di superficie CD34+CD38+ ed è in grado di dar luogo all'eterogeneità istologica della malattia quando trapiantata in animali SCID. Analogamente, il cancro alla mammella comprende una sottopopolazione (1-10%) di CD44+CD24^{low} lin⁻. Queste cellule CSC putative possono formare tumori in topi NOD/SCIP anche se l'impianto prevede l'introduzione di sole 200 unità. È interessante notare come molti marcatori di superficie siano presenti in CSC isolate da diversi tipi di cancro, forse ad indicare che si attivano le stesse vie di segnalazione della trasduzione. La deregolazione della segnalazione della via di Wnt (Reya e Clevers, 2005) per esempio, è stato dimostrato essere un evento

Tab. 1

Tumore	Marcatore CSC	Bibliografia
Leucemia	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	Nat Med 3: 730 (1997)
Mammella	CD44 ⁺ /CD24 ^{low} lin ⁻	PNAS 100: 3983 (2003)
Cervello	CD133 ⁺	Nature 432: 396 (2004)
Mieloma	CD138 ⁻	Blood 103: 2332 (2004)
Prostata	CD44 ⁺ /CD133 ⁺	Blood 103: 2332 (2004)
Polmone	Sca-1 ⁺ /CD34 ⁺ /Pecam ⁻	Cell 121: 823 (2005)

precoce nella progressione maligna dei tumori del colon, della mammella, della pelle e del tessuto ematopoietico ed è probabilmente responsabile dell'attivazione dell'automantenimento delle cellule staminali in corrispondenza delle nicchie tessuto-specifiche. Maggiori dettagli e informazioni possono essere desunte dal sito di *MCSCs* (l'acronimo sta per "Migrating Cancer Stem Cells"), il sito del consorzio europeo di scienziati interessati allo studio delle CSC coordinato da Riccardo Fodde (www.mcscs.eu). Lo scopo principale del consorzio è lo studio dei meccanismi molecolari e cellulari sottesi all'iniziazione, allo stabilirsi ed al propagarsi del cancro.

Epigenoma e CSC

Un vasto e nuovo campo di indagine è quello dell'epigenomica, lo studio di tutte quelle caratteristiche di composizione e organizzazione del genoma che non coinvolgono la sua struttura primaria. Il più noto dei fenomeni epigenomici è quello della metilazione transiente di alcune basi del DNA oppure di alcuni aminoacidi. E dunque pure le mutazioni che coinvolgono caratteristiche epigenomiche possono svolgere un ruolo nella trasformazione neoplastica. A questo proposito il lettore trarrà vantaggio dalla lettura del più recente studio in proposito, quello del gruppo di Marco Marra, non prima di aver ricordato alcuni dati essenziali sulla metilazione delle proteine. Le modificazioni post-traduzionali degli istoni, in modo particolare la metilazione delle lisine, sono in grado di alterare la conformazione strutturale della cromatina e di conseguenza di modulare la espressione genica (al punto che si parla di un codice istonico!). I promotori di geni attivi nella trascrizione sono connotati da una marcatura con un gruppo CH₃ sull'istone 3 in posizione lisina 4 (H3K4me₃) mentre la sequenza genica centrale presenta una metilazione sulla lisina in posizione 36 (H3K36me₃). Al contrario, i geni inattivi sono metilati in lisina 27 (H3K27me₃) ed i geni silenziati in modo permanente sono caratterizzati dalla metilazione della lisina in posizione 9 (H3K9me₃) e dei gruppi CpG dei promotori. Ora, Marco Marra ed i suoi collaboratori (Morin et al., 2010) hanno dimostrato che in alcune forme di linfoma sono sempre presenti delle mutazioni che riguardano un enzima (un istonemetiltransferasi) capace di metilare H3Lys27 H3K27. Le mutazioni che riguardano questo enzima alterano un singolo residuo di tirosina capace di ridurre la abilità della proteina a metilare (e dunque a silenziare) determinando in tal modo l'accensione di geni non permissivi e capaci di far proliferare indefinitamente le cellule.

Le CSC offrono prospettive per il miglioramento della prognosi e il trattamento del cancro

La dimostrazione dell'esistenza in diversi tumori maligni umani di una minoranza di CSC in grado di riprodurre l'eterogeneità e la malignità delle malattie umane in esperimenti animali ha diverse implicazioni per la prognosi e il trattamento del cancro. Uno degli strumenti attualmente considerati come una promet-

tente risorsa per la prognosi e la valutazione della risposta a trattamenti farmacologici è l'analisi del profilo di espressione. Se la nascita del tumore e il comportamento invasivo è dovuto ad una minoranza di cellule CSC, la loro quantità all'interno della massa tumorale potrebbe correlare con il rischio per il paziente di sviluppare metastasi locali e a distanza (Brabletz et al., 2005).

L'identificazione di caratteristiche specifiche delle CSC grazie al profilo di espressione di CSC permetterebbe l'analisi bioinformatica del profilo tumorale e una maggiore accuratezza nella predizione clinica del comportamento metastatico e in risposta al trattamento. Inoltre, faciliterebbe l'identificazione di nuove terapie che hanno le CSC come bersaglio. Oltre che dalle tradizionali chemioterapie e radioterapie, la riduzione del tumore potrebbe derivare dalla morte di cellule tumorali differenziate. Inoltre, se le CSC costituiscono una minoranza delle cellule tumorali e sono caratterizzate da una resistenza intrinseca alla radiazione e agli agenti chimici, probabilmente sono in grado di resistere a terapie adiuvanti e dare origine alla ripresa del cancro. Quindi, lo sviluppo di terapie che agiscono in modo specifico contro le CSC è probabile che dia luogo ad un aumento considerevole della sopravvivenza a lungo termine dei pazienti. Sotto il profilo della radioterapia si aprono ora a livello nazionale, con l'entrata in funzione a Pavia del *Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica* (CNAO), nuove e promettenti possibilità in quanto sarà possibile trattare con dosi elevatissime di energia (impiegando ad esempio adroni C^{14}) il tumore. L'ipotesi delle CSC suggerisce inoltre nuove prospettive per la rilevazione delle cellule cancerose circolanti dopo la rimozione chirurgica del tumore maligno primario. In generale, le cellule cancerose circolanti nel sangue e nel midollo osseo sono note essere presenti in elevate quantità nei pazienti affetti da cancro. Le CSC, a causa della loro plasticità intrinseca e della capacità di transdifferenziare in seguito a stimoli provenienti dall'ambiente circostante, rappresentano una sottopopolazione, molto rilevante dal punto di vista clinico, di cellule cancerose migranti in grado di riprodurre la lesione primaria in siti distanti. L'identificazione dei marcatori di superficie delle CSC per specifici tipi di cancro (come riportato in tabella) probabilmente permetterà l'identificazione e la quantificazione di CSC migranti nei fluidi corporei, per guidare il trattamento e la sorveglianza postclinica del decorso del paziente affetto da cancro. È dunque centrale lo studio e l'identificazione dei marcatori di superficie, per la loro possibilità di essere utilizzati, in prospettiva, per distinguere tessuti sani da tessuti malati. La caratterizzazione molecolare conseguente delle cellule staminali purificate attraverso l'analisi del profilo genetico e proteico porrà le basi per gli studi che potrebbero portare a chiarire i meccanismi molecolari e cellulari che regolano l'automantenimento e il differenziamento nell'omeostasi e nel cancro. Questi progressi nella nostra conoscenza della biologia delle CSC apriranno nuove porte per il miglioramento della diagnosi di rischio, nella prognosi, nella sorveglianza, nella prevenzione e nella terapia mirata del cancro. A questo scopo, sia la ricerca applicata che di base devono essere sostenute, combinando l'analisi genetica, cellulare e molecolare di modelli sperimentali in vivo e in vitro di CSC con l'identificazione, purificazione e analisi delle stesse ottenute da biopsie e fluidi corporei di pazienti affetti da cancro. Per molti

anni, la terapia medica dei tumori si è basata sulla chemioterapia, cioè sull'uso di farmaci che esercitano un'azione tossica sulle cellule. La chemioterapia è una terapia aspecifica che agisce indiscriminatamente su tutte le cellule, neoplastiche e normali. Negli ultimi anni, i progressi conseguiti nella biologia dei tumori hanno consentito di individuare numerose alterazioni molecolari che possono costituire il bersaglio di farmaci che, a differenza dei farmaci chemioterapici tradizionali, hanno un'azione molto più specifica e possono, quindi, risultare meno tossici per le cellule normali. È nata, così, la terapia molecolare del cancro che si è già dimostrata efficace in varie neoplasie, quali la leucemia mieloide cronica, il mieloma, il cancro della mammella, il cancro del colon-retto, i tumori del rene, i tumori stromali gastrointestinali. La Biologia delle CSC promette di potenziare queste possibilità rivoluzionando il settore oncoterapico dove è sempre rilevante ricordare che un uomo su due e una donna su tre si ammala di cancro e in un caso su sei il paziente curato avrà una ricaduta.

Bibliografia

1. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5: 744-749.
2. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*. 1975; 255: 197-200.
3. Cairns J. Somatic stem cells and the kinetics of mutagenesis and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 2002; 99: 10567-10570.
4. Cairns J. Cancer and the Immortal Strand Hypothesis. *Genetics*. 2006; 174: 1069-1072.
5. David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*. 2010; 463: 364-368.
6. Fodde R. Stem cells and metastatic cancer: fatal attraction? *PLoS Med*. 2006; 3 (12): e482. doi:10.1371/journal.pmed.0030482.
7. Galderisi U, Cipollaro M, Giordano A. Stem cells and brain cancer. *Cell Death and Differentiation*. 2006; 13: 5-11.
8. Gaspar C, Fodde R. R APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *Int J Dev Biol*. 2004; 48: 377-386.
9. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
10. Huen MSY, Sy SMH, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11: 138-148.
11. Kawamura et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009; 460: 1140-1145.
12. Muller PAJ, Caswell PT, Doyle B, Iwanicki MP, Tan EH, Karim S, Lukashchuk N, Gillespie DA, Ludwig RL, Gosselin P, Cromer A, Brugge JS, Sansom OJ, Norman JC, Vousden KH. Mutant p53 Drives Invasion by Promoting Integrin Recycling. *Cell*. 2009; 139: 1327-1341.
13. Perez-Caro M, Coboleda C, Gonzalez-Herrero I, Vicente-Duenas C, Bermejo-

- Rodriguez C, Sanchez-Beato M, Orfao A, Pintado B, Flores T, Sanchez-Martin M, Jimenez R, Piris MA, Sanchez-Garcia I. Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment. *EMBO J*. 2009; 28: 8-20.
14. Rando TA. The immortal strand hypothesis: segregation and reconstruction. *Cell*. 2007; 129: 1239-1243.
 15. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414: 105-111.
 16. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005; 434: 843-850.
 17. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-676.
 18. Wu M, Pastor-Pareja JC, Xu T. Interaction between RasV12 and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature*. 2010; 463: 545-548.
 19. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Marra MA, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*. 2010; 42: 181-185.

Intervento di meccanismi epigenetici nella formazione di tumori

Valeria Santini

Unità Funzionale di Ematologia, Policlinico di Careggi, Firenze

Caratteristiche tipiche delle cellule neoplastiche sono una alterata espressione genica e una alterata funzione genica. Questa disregolazione è determinata dal concorrere di cause genetiche e, con crescente evidenza, di cause epigenetiche. Difatti, il fenotipo cellulare, sia fisiologicamente che nei processi neoplastici, è stabilito da determinanti genetici ed epigenetici. Le modificazioni epigenetiche sono modificazioni del DNA e della cromatina potenzialmente reversibili e trasmesse da una cellula alla sua progenie. Queste modificazioni sono capaci di provocare alterazioni della espressione genica, senza modificare la sequenza del DNA e senza nessuna “nuova” informazione genetica. Questi processi sono la metilazione dei *promoter* dei geni, le modificazioni post traslazionali degli istoni e le attività dei cosiddetti *interfering RNA* (microRNA). La metilazione del DNA e le modificazioni istoniche esercitano un controllo epigenetico, mentre i miRNA, che non sono esattamente regolatori epigenetici, modulano finemente l'espressione genica a livello del mRNA. Normalmente, esiste un equilibrio tra la eucromatina, ovvero la regione della cromatina disponibile e accessibile ai fattori di trascrizione ed ai co-attivatori e la eterocromatina, ovvero la cromatina non trascrivibile. Nella eterocromatina il filamento del DNA è strettamente avvolto attorno al *core* istonico, il “rocchetto” costituito da 4 coppie di proteine istoniche (2 H3, 2 H4, 2 H2b, 2 H2a). I due stati della cromatina sono determinati da una serie complessa di alterazioni chimiche che avvengono direttamente sul DNA, per la precisione sui residui citidinici situati nelle isole CpG e sulle code lisiniche delle proteine istoniche. Le citidine sono mutilate da enzimi detti DNA metiltransferasi (DNMT) che trasferiscono residui metilici nelle regioni specifiche. Questo modificazione chimica covalente aggiunge un gruppo CH₃ sul carbonio in posizione 5 dell'anello della citidina situata nel contesto della sequenza nucleotidica 5'-CpG-3', la cui frequenza nel DNA è peraltro inferiore a quella teoricamente calcolabile. Tale processo recluta localmente le cosiddette *methyl binding proteins* (MBP) che legano complessi proteici contenenti molecole corepressori, istone deacetilasi (HDAC) e DNMT. I dinucleotidi CpG sono raggruppati nelle regioni promotrici del 50% dei geni umani (isole CpG 0.5 - 5 kb ogni 100 kb). Nelle cellule somatiche, normalmente le isole CpG non sono metilate. La loro metilazione determina silenziamento genico. D'altra parte, l'attività delle HDAC porta anche alla metilazione delle proteine istoniche, grazie alle istone metiltransferasi. Così, DNMT e HDAC cooperano per determinare la conforma-

zione tipica della eterocromatina e il silenziamento genico. Nella eucromatina, con DNA non metilato, gli istoni H3 e H4 sono acetilati e vi è la metilazione della lisina 4 di H3, mentre nella eterocromatina gli istoni H3 e H4 non sono acetilati ed è presente metilazione della lisina 9. Non è chiarissimo quale dei due fenomeni dia inizio alle modificazioni di assetto della cromatina e quale sia senza dubbio il fenomeno limitante e determinante, benchè vi siano evidenze che la metilazione ha un peso maggiore della acetilazione istonica. I geni possono essere fisiologicamente silenziati durante l'embriogenesi, la differenziazione cellulare, per poi essere riespressi in altri momenti. Questi processi di modificazione epigenetica con modulazione di espressione e silenziamento genico sono profondamente alterati nelle cellule neoplastiche, nelle quali il silenziamento genico è mantenuto e i fenomeni suddescritti stabilizzati con legame dei complessi corepressivi al DNA. Le alterazioni epigenetiche più tipiche delle cellule trasformate sono:

- ipometilazione globale del DNA,
- iperespressione delle DNMT,
- ipermetilazione localizzate delle isole CpG.

La ipermetilazione di cui sopra non è in contrasto con la ipometilazione globale del DNA riscontrata nei tumori. Difatti, rappresenta una redistribuzione delle 5-metilcitosina nel genoma, piuttosto che un incremento nel livello globale della metilazione. È molto interessante, a questo proposito, che si sia osservato che larghi frammenti di DNA possono divenire abnormemente metilati nei tumori (Frigola, 2006). Inoltre, è stato ipotizzato che i cambiamenti nella metilazione che avvengono in singoli tumori costituiscano un vero e proprio fenotipo distinto (Toyota, 1999), detto "*CpG island methylator phenotype*". Certamente, queste ipermetilazioni localizzate inducono il silenziamento di geni oncosoppressori, facilitando la progressione tumorale. Importanti e fondamentali sono le modificazioni istoniche diffuse nel genoma. Per esempio, la perdita della acetilazione sulla lisina 16 e la trimetilazione della lisina 20 dell'istone H4 sono considerati segni tipici e comuni di trasformazione neoplastica (Fraga, 2005), mentre modificazioni globali del pattern di acetilazione istonica predicono il rischio di ricaduta nel tumore della prostata (Seligson, 2005). Vi sono altre evidenze che indicano il coinvolgimento nella carcinogenesi di cambiamenti globali della acetilazione e metilazione istonica (per esempio nella famiglia dei geni *polycomb*) (Valk-Lingbeek et al., 2004). Oltre ai geni oncosoppressori, altri geni frequentemente silenziati nei tumori appartengono alle seguenti categorie: geni della riparazione del DNA, recettori ormonali, molecole di adesione, microRNA. Alcuni specifici tumori presentano sempre metilazione di geni specifici e esistono induttori della metilazione "specifici" come l'*Helicobacter Pylori*. Inoltre, da un punto di vista meccanicistico, è noto che bassi livelli di trascrizione favoriscono la metilazione del gene (Takeshima, 2010). Tra i geni oncosoppressori più frequentemente silenziati si annoverano quelli che codificano per proteine regolatorie del ciclo cellulare, come p15ink4b, p16/CDKN2, p14, p21, p73 e Rb. Tra i geni ripartori del DNA ricordiamo: hMLH1, O6-MGMT, GST-Pi and BRCA1 (Santini, 2001). Inoltre, molti dei geni silenziati nei tumori sono soppressi anche in malattie familiari predisponenti allo sviluppo di neoplasie familiari: il gene della trasduzione del segnale

APC (cancro del colon), e-cadherina, Rb1 gene regolante il ciclo cellulare e mutato nel retinoblastoma e VHL (von Hippel Lindau) *tumour suppressor* mutato nel cancro del rene. Questi geni, ed altri ancora, sono silenziati in casi sporadici di tumore, quali ad esempio il gene per il recettore degli androgeni, represso in alcuni casi di tumore della prostata ormone-dipendente. In molte neoplasie ematologiche si nota la repressione del gene oncosoppressore/controllore del ciclo cellulare p15/CDKN2B, mentre il gene p16/CDKN2 subisce una perdita funzionale in molti tumori solidi; il gene trasportatore di farmaci MDR1 è silenziato in numerosi pazienti con leucemia acuta (Santini, 2001). Infine, molti geni codificanti proteine coinvolte nell'apoptosi, come la DAPchinasi Caspase 8, TMS-1 and TRAIL mostrano promoter metilati. Alla stessa stregua, geni regolanti l'invasività tumorale e le metastasi, quali E-cadherin, VHL, APC, LKB1, TIMP-3, THBS1 e recettori come Oestrogen receptor (ER), RARA-beta e SOCS-1 (Herman and Baylin 2003) sono assai frequentemente non espressi. Il perché si determini questa ipermetilazione regionale nella trasformazione neoplastica non è chiarito, ma è stato suggerito che questo fenomeno mimica ciò che si osserva fisiologicamente nell'invecchiamento, dove si osserva una ipometilazione globale, con isole CpG ipermetilate a livello di geni critici. Sicuramente, la regolazione epigenetica dell'espressione genica deve ancora essere analizzata a fondo, affinché si possano applicare strategie terapeutiche mirate a modificarla e a restaurare il fenotipo normale.

Bibliografia

1. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005; 37: 391-400.
2. Frigola J, Song J, Stirzaker C, et al. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet.* 2006; 38: 540-549.
3. Jones PA, Baylin S. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007; 128: 683-692.
4. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, et al. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer.* 2001; 1: 194-202.
5. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med.* 2001; 134 (7): 573-586.
6. Seligson DB, Horvath S, Shi T, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature.* 2005; 435: 1262-1266.
7. Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, et al. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet.* 2007; 39: 232-236.
8. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 8681-8686.
9. Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen. M. Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell.* 2004; 118: 409-418.
10. Takeshima H, Ushijima T. Methylation destiny: Moira takes account of histones and RNA polymerase II. *Epigenetics.* 2010 Feb 27; 5 (2).

Tumori, immunità e microambiente

Paola Allavena

Laboratorio di Immunologia cellulare, IRCCS Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (MI)

La storia dell'immunologia dei tumori in breve

Gli studi sul rapporto fra immunità e tumori iniziano più di 100 anni fa, in un tempo in cui gli esperimenti, basati sul trapianto di tumori fra animali geneticamente diversi (non inbred), non consentivano di distinguere fra risposta contro un trapianto allogeneico e risposta strettamente antitumorale. Questi studi, pur viziati da questo equivoco di fondo, avevano giustamente intuito che il tumore poteva essere visto dall'organismo come un tessuto "estraneo".

L'esistenza di antigeni tumorali riconosciuti dalle cellule effettrici dell'immunità specifica (linfociti T) e di risposte potenzialmente efficaci venne formalmente dimostrata grazie all'uso di animali inbred negli anni '50 e '60 del XX secolo. Negli stessi anni viene formulata da Thomas e da Burnet la teoria della sorveglianza immunologica: il sistema immunitario controlla ed elimina le cellule che vanno incontro a trasformazione neoplastica "sorvegliando" l'organismo contro l'insorgenza delle degenerazioni di tipo maligno. Occorrerà aspettare 40 anni per identificare molecolarmente il primo degli antigeni di un tumore umano. La scoperta, da parte del laboratorio di Thierry Boon in Belgio, dell'antigene MAGE-1 del melanoma, ha costituito una pietra miliare per la comprensione del rapporto fra sistema immunitario e cancro. Ad oggi sono stati identificati e sequenziati diversi antigeni tumorali riconosciuti dai linfociti T.

Questi progressi dell'immunologia molecolare e cellulare sono alla base del "Rinascimento" degli studi di immunologia dei tumori iniziato negli anni '90 con il clonaggio di MAGE-1, e tuttora perdurante. Il ruolo protettivo dell'immunità specifica cellulo-mediata contro la crescita dei tumori è confermato dall'osservazione che tumori umani, come il carcinoma del colon retto e il melanoma, che contengono un numero elevato di linfociti T, hanno in genere prognosi migliore. Attualmente si perseguono approcci sperimentali che mirano a stimolare l'attività citotossica dei linfociti T contro le cellule neoplastiche.

Le cellule dell'immunità innata invece, e soprattutto i macrofagi, se presenti in elevate quantità nel microambiente tumorale, sono più frequentemente associati a prognosi infausta, come vedremo in seguito.

Immunità innata, infiammazione e tumori

I meccanismi dell'immunità innata costituiscono primariamente una barriera difensiva nei confronti dei patogeni. La risposta immunitaria innata e la risposta infiammatoria acuta sono sinonimi dello stesso processo fisiopatologico che il nostro organismo mette in atto per difendersi dagli insulti esterni (micro-organismi, danno tissutale). Dal punto di vista cellulare essi sono costituiti dai fagociti (fagociti mononucleati o monociti-macrofagi e polimorfonucleati) e dalle cellule NK, anche se per queste ultime è difficile l'assegnazione alla immunità innata o all'immunità specifica, data la loro capacità di riconoscere le molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) di classe I. Le cellule dell'immunità innata comunicano ed agiscono attraverso le citochine infiammatorie primarie, prototipo delle quali sono interleuchina-1 (IL-1) e il fattore di necrosi tumorale (TNF).

Il ruolo dei meccanismi/cellule dell'immunità innata nell'evoluzione della malattia neoplastica, in particolare dei fagociti mononucleati, è stato oggetto di intensa discussione ed è andato incontro a profonda revisione nel corso del tempo.

Nel 1863 Rudolf Virchow identificò la presenza di un infiltrato linforeticolare nei tessuti neoplastici, e suggerì che la presenza di leucociti dell'ospite all'interno dei tumori fosse il riflesso dell'origine del cancro nelle sedi di infiammazione cronica. Benché questa visione abbia avuto fortune alterne per oltre un secolo, le evidenze raccolte negli ultimi 20 anni, soprattutto riguardo il microambiente infiammatorio nei tessuti neoplastici, confermano in generale un legame stretto fra cancro e infiammazione cronica. Si stima che circa il 15% dei tumori siano associati ad agenti infettivi che sostengono una infiammazione cronica. Inoltre una serie di patologie autoimmuni e infiammatorie, di origine ignota o indotte da agenti chimici e fisici, ma caratterizzate da infiammazione persistente, sono associate a un aumento del rischio di patologia maligna.

Si ritiene quindi che l'infiammazione e il cancro si influenzino a vicenda. La Tabella 1 elenca in modo sintetico le evidenze epidemiologiche e sperimentali che connettono l'infiammazione cronica alla progressione tumorale.

Le cellule e i mediatori solubili dell'infiammazione (citochine, fattori di crescita)

Tab. 1 - Evidenze di un ruolo pro-tumorale dell'infiammazione.

-
- Le malattie infiammatorie croniche fanno aumentare il rischio di sviluppare alcuni tipi di tumori.
 - I farmaci anti-infiammatori non steroidei riducono il rischio di sviluppare alcuni tumori (come il colon e la mammella) e ne riducono la mortalità.
 - Le vie di segnale coinvolte nell'infiammazione agiscono a valle delle mutazioni oncogeniche (come le mutazioni dei geni che codificano RAS, MYC e RET).
 - Le cellule infiammatorie, le citochine e le chemochine sono presenti nel microambiente del tumore già dai primi stadi di sviluppo.
 - L'inibizione di mediatori infiammatori (chemochine e citochine come TNF α e IL-1 β), di fattori trascrizionali chiave per l'infiammazione (come NF- κ B e STAT3), e di cellule infiammatorie fa diminuire l'incidenza e la disseminazione dei tumori.
 - Il trasferimento di cellule infiammatorie o la sovra-espressione di citochine infiammatorie promuove lo sviluppo dei tumori nei modelli animali.
-

costituiscono una parte importante del microambiente tumorale. In alcuni tumori la condizione infiammatoria precede lo sviluppo della neoplasia; in altri casi, eventi genetici (come l'attivazione di diversi tipi di oncogeni per mutazione, riarrangiamento o amplificazione cromosomici, e/o l'inibizione di geni che sopprimono il tumore) inducono nelle cellule così trasformate la produzione di mediatori infiammatori, generando un microambiente infiammatorio anche in assenza di precedenti condizioni infiammatorie/infettive (per esempio i tumori della mammella). Qualunque sia la via, nelle cellule tumorali vengono attivati i fattori di trascrizione, che controllano la produzione di mediatori infiammatori, incluse le citochine e le chemochine, e di prostaglandine.

Questi fattori reclutano e attivano i diversi leucociti, soprattutto quelli della linea mielomonocitaria.

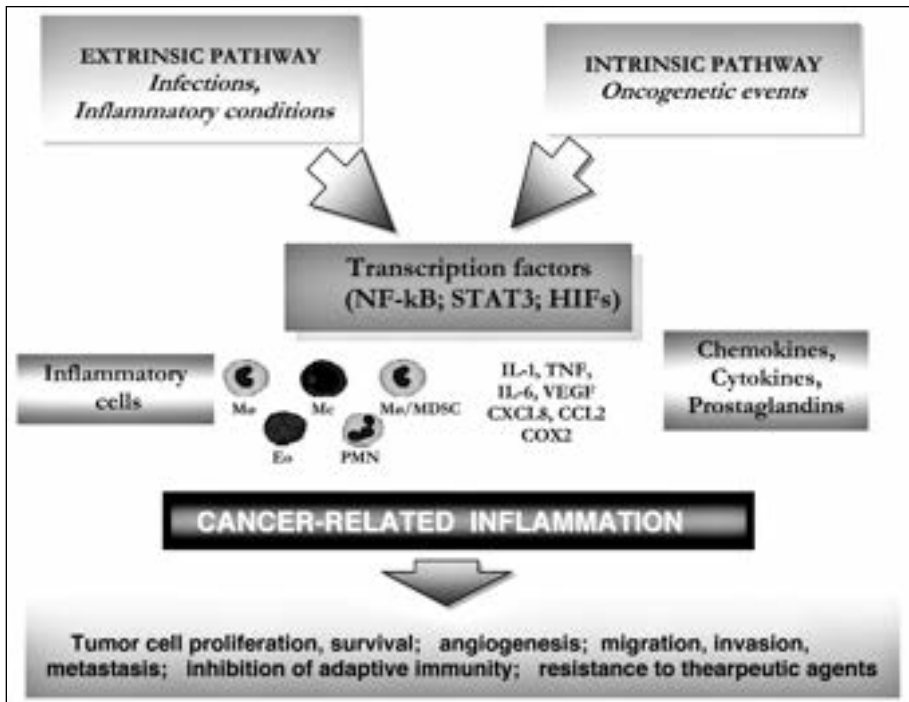


Fig. 1 - Vie di connessione tra infiammazione e cancro. L'infiammazione e il cancro si influenzano a vicenda, attraverso fattori estrinseci (condizioni infiammatorie, infezioni) ed intrinseci (eventi genetici: attivazione di oncogeni per mutazione, riarrangiamento o amplificazione, inibizione di geni che sopprimono il tumore). Entrambe le vie portano all'attivazione di fattori di trascrizione nelle cellule tumorali, come il fattore nucleare κ B (NF- κ B), il fattore 3 che traduce il segnale e attiva la trascrizione (STAT3), fattori inducibili da ipossia (HIFs). I fattori di trascrizione controllano la produzione di mediatori infiammatori, incluse le chemochine, le citochine, e la produzione di ciclossigenasi 2 (COX2) e quindi di prostaglandine. Questi fattori reclutano e attivano i diversi leucociti, soprattutto quelli della linea mielomonocitaria. Le chemochine attivano i fattori di trascrizione nelle cellule infiammatorie, stromali e tumorali, provocando una ulteriore produzione di fattori infiammatori e generando così un microambiente infiammatorio (infiammazione legata al tumore). L'infiammazione persistente associata al tumore favorisce la crescita del tumore stesso.

Le citochine attivano gli stessi fattori di trascrizione nelle cellule infiammatorie, stromali e tumorali, provocando una ulteriore produzione di fattori infiammatori e generando così un microambiente infiammatorio collegato al tumore (Fig. 1). Durante lezione verranno esaminate le principali componenti cellulari e i mediatori solubili del microambiente infiammatorio dei tumori e, successivamente, come esse modifichino la crescita e disseminazione neoplastica.

Infiltrato leucocitario dei tumori

Il tumore è costituito da cellule neoplastiche e da uno stroma di supporto, comprendente una matrice di fibrina che avvolge vasi sanguigni neoformati e cellule infiammatorie. I tessuti neoplastici, sia nella componente strettamente tumorale che stromale, sono caratterizzati dalla presenza di leucociti infiltranti. In alcuni casi l'infiltrato è estremamente prominente. Ad esempio nelle fasi precoci del sarcoma di Kaposi, l'angiogenesi, la proliferazione stromale e la presenza di un ricco infiltrato, hanno reso per lungo tempo dubbia la natura neoplastica di questa malattia.

I macrofagi costituiscono di regola la principale componente dell'infiltrato leucocitario nella maggior parte delle neoplasie. I macrofagi associati ai tumori (TAM) derivano dai monoliti circolanti e sono attratti all'interno della massa tumorale da citochine dotate di attività chemiotattica, denominate chemochine. Le cellule tumorali producono comunemente diverse chemochine, in particolare la chemochina nota come Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1), ora denominata CCL2. La quantità dei macrofagi presenti all'interno dei tumori è dettata dalla produzione di MCP1/CCL2 e anche di altre chemochine. Inoltre molti tumori producono fattori di crescita, come il Colony Stimulating Factors (CSF) macrofagico (M-CSF), che prolunga la sopravvivenza dei macrofagi all'interno dei tumori.

Se opportunamente stimolati da citochine immunostimolatorie, quali Interferone (IFN) γ , i macrofagi sono potenzialmente in grado di esercitare attività citotossica nei confronti delle cellule tumorali o di attivare circuiti di distruzione tissutale. Tuttavia nel tessuto tumorale non è di regola spesso IFN γ , ma altre citochine che polarizzano i TAM ad un fenotipo "alternativo" e protumorale.

I TAM infatti producono fattori di crescita per le cellule tumorali e per i vasi sanguigni.

L'ipotesi della "bilancia macrofagica" esprime questa ambivalenza e ambiguità del ruolo dei macrofagi nel controllo della crescita neoplastica. La "bilancia macrofagica" può avere effetti netti diversi in stadi diversi della crescita del tumore o in un contesto terapeutico. Nei primi stadi della cancerogenesi le risposte innate hanno un ruolo positivo e sono probabilmente coinvolte nell'attivazione di una sorveglianza efficace mediata dall'immunità adattativa che elimina le cellule tumorali. Quando il tumore è ormai stabilizzato e le cellule neoplastiche sono sfuggite al controllo immunologico, l'infiammazione lenta e continua sostenuta dai TAM favorisce la crescita delle cellule tumorali, l'angiogenesi e la metastatizzazione (Fig. 2). Nelle strategie terapeutiche bisogna quindi tenere presente il

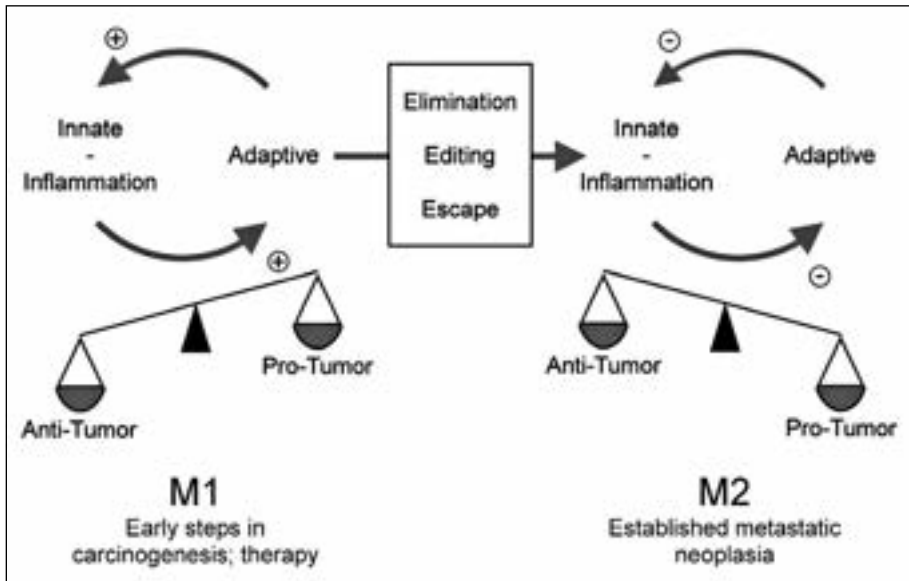


Fig. 2 - La bilancia macrofagica e promozione tumorale. Durante le prime fasi della cancerogenesi prevalgono i macrofagi M1, che hanno attività antitumorale e partecipano alla induzione della risposta adattativa antitumorale che contribuisce alla loro polarizzazione M1. Nel tumore stabilizzato e avanzato, dove le cellule tumorali persistenti sono sfuggite all'attacco immune, predominano i macrofagi polarizzati in senso M2, che sopprimono l'immunità adattativa, favorendo la loro polarizzazione M2.

duplice potenziale che i macrofagi hanno nelle diverse fasi della crescita del tumore.

La popolazione linfocitaria prevalente all'interno di alcuni tumori immunogenici è costituita da linfociti T CD8+, che come ricordato sopra sono gli effettori citotossici principali che possono limitare la crescita neoplastica. In scarsa frequenza sono presenti nei tumori solidi anche cellule Natural Killer (NK). Tuttavia è stato osservato che in molti tumori prevalgono linfociti orientati in senso Th2, i quali producendo principalmente IL-4, IL-5 e non interferone IFN γ sono inefficaci nel sostenere una risposta anti-tumorale. Inoltre possono essere presenti linfociti T con attività regolatoria Treg, in grado di sopprimere l'attività citotossica dei linfociti CD8+. In realtà la situazione più comune nei tumori in stadio avanzato è che la componente leucocitaria all'interno del micro-ambiente tumorale si trova in uno stato di immuno-soppressione promosso dalla malattia.

Citochine pro-infiammatorie

Nel microambiente dei tumori sono presenti molte citochine infiammatorie, fattori di crescita e chemochine. Al contrario, le citochine coinvolte nell'immunità specifica (es. IL-2, IFN γ), sono raramente espresse. Numerose evidenze suggeriscono che le citochine infiammatorie e le chemochine, prodotte dalle cellule tumorali e dai leucociti infiltranti possono contribuire alla progressione neoplastica.

Il TNF è un mediatore fondamentale dei processi infiammatori, dotato di attività diverse e pleiotropiche, che da una parte favorisce la distruzione cellulare e tissutale, e dall'altro promuove la ricostruzione dei tessuti. Infatti, se da una parte TNF induce apoptosi e danno dei tessuti, dall'altra costituisce un fattore di crescita per i fibroblasti. Ancora, è in grado di danneggiare l'albero vascolare ma, al tempo stesso, di indurre la produzione di fattori dell'angiogenesi. Nelle malattie neoplastiche, la somministrazione locale di TNF ad alte dosi causa un danno vascolare con un quadro di necrosi emorragica selettiva dei tessuti neoplastici. Tuttavia, quando prodotto in modo cronico e continuo a livello tumorale, il TNF agisce come un fattore di promozione della crescita neoplastica, contribuendo al rimodellamento tissutale e allo sviluppo della stroma necessario per la crescita e la disseminazione neoplastica.

L'Interleuchina 1 promuove direttamente la crescita di alcune linee tumorali e ne favorisce la metastatizzazione. Importante è il ruolo di IL-1 e, in particolare, di IL-6 nella promozione della crescita delle cellule di mieloma multiplo e nella loro resistenza a terapia. Animali geneticamente modificati hanno fornito evidenze dirette indicative per un ruolo di queste citochine nei processi di cancerogenesi. Le cellule tumorali, lo stroma e i macrofagi sono anche fonte di produzione di chemochine, abbondantemente espresse nei tumori. Come accennato sopra, le chemochine regolano il richiamo dei leucociti dal sangue al tessuto tumorale e sono caratterizzate da una certa specificità per i diversi subset leucocitari. Oltre a CCL2, che richiama monociti, altre chemochine agiscono sui linfociti o sugli eosinofili (ad esempio CCL17 e CCL11). Quindi il tipo di infiltrato leucocitario di un tumore è determinato dai fattori chemiotattici che sono espressi in quel micro-ambiente.

Le chemochine svolgono anche altre funzioni importanti nei tumori: alcuni ligandi promuovono lo sviluppo dell'angiogenesi e fungono da fattori di crescita e di mobilitazione per le cellule tumorali stesse, che possono esprimere, come i leucociti, i recettori per chemochine. Questo circuito è stato dimostrato nel melanoma sperimentale e umano per i recettori CXCR1 e CXCR2 che legano CXCL8, o IL-8. Infine, evidenze recenti suggeriscono che le chemochine possono essere importanti nel guidare la metastatizzazione delle cellule neoplastiche in organi specifici. Durante la lezione faremo un esempio nel tumore del pancreas.

Questioni aperte sulla capacità pro-tumorale dell'infiammazione

La relazione tra infiammazione e cancro è ormai ben stabilita, ma restano ancora diversi punti non risolti.

Innanzitutto non è chiaro se l'infiammazione sia sufficiente per far sviluppare il tumore, cioè se possa causare la neoplasia in assenza di un agente cancerogeno esterno. Recenti evidenze suggeriscono che lo stato infiammatorio cronico sia una condizione favorente l'instabilità genetica e conseguentemente l'alterazione del DNA (es. danni ai meccanismi di riparo del DNA o alterazioni dei checkpoint del ciclo cellulare). Ad esempio nel modello murino di infiammazione dell'intestino causata dalla mancanza di IL-10, la frequenza di mutazioni casuali al

DNA nel colon è 4-5 volte maggiore che nei controlli, pur in assenza di stimoli cancerogeni esterni. Anche nell'uomo la frequenza di mutazioni casuali nei tessuti tumorali è maggiore che nei corrispondenti tessuti normali. Nei tessuti normali la frequenza di mutazioni casuali è bassissima, ma aumenta in tessuti infiammati. Le specie reattive dell'ossigeno sono state proposte come possibili "cancerogeno infiammatorio" endogeno.

Un secondo punto riguarda la diversità e plasticità dell'infiammazione cronica e dei macrofagi, che sono le cellule maggiormente responsabili del mantenimento dell'infiammazione.

L'infiammazione è differente in tumori diversi ed è quindi necessario definire quali siano le componenti cellulari e molecolari comuni a tutte le risposte infiammatorie che favoriscono il tumore e quali siano quelle specifiche di particolari tessuti e tumori.

Il terzo punto è la comprensione della bilancia tra le risposte infiammatorie che favoriscono il tumore e quelle che lo possono inibire e di come si possa quindi attivare una risposta immune adattativa efficace.

Infine, il punto più importante è se sia possibile utilizzare le conoscenze sulla relazione infiammazione-tumori per prevenire, fare diagnosi e curare il cancro. Le cellule tumorali sono "bersagli mobili" che diventano resistenti anche alle terapie mirate più sofisticate. Si può pensare che una terapia combinata che colpisca le cellule tumorali e l'altra "parte" della massa tumorale (cioè le cellule infiammatorie) possa più efficace e dare immunità adattativa duratura contro le cellule tumorali.

Bibliografia essenziale

1. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454: 436-444.
2. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev*. 2008; 222: 155-161.
3. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*. 2002; 3: 991-998.
4. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357: 539-545.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

Leukemic stem cells and the evolution of the concept of the tumor stem cell

Lucio Luzzatto

Istituto Toscano Tumori, Firenze

The concept of tumor stem cell (TSC) originates from two basic sets of observations. On one hand, since so many features of normal development are reflected in a tumor, this might retain also the hierarchy of:

- i) stem cells,
- ii) transit amplifying cells and
- iii) end cells that is characteristic of the tissue from which it originates.

On the other hand, just like repopulation of haematopoietic bone marrow - for instance - requires haematopoietic stem cells (or HSCs: transit cells or end cells will not do), similarly it is observed that in most cases only a small fraction of tumor cells are able to form a new tumor.

While these experimental findings are robust, extending to tumors the notion of stem cells has several implications that are potentially far-reaching but must be taken with caution.

- a) TSCs would be expected to resemble normal stem cells in many respects, including (i) self-renewal, (ii) ability to differentiate and (iii) low rate of cycling.
- b) It is tempting to postulate that for a tumor to develop a tumor stem cell must originate - through somatic mutations - from a normal stem cell: but it is also possible that mutations in a non-stem cell, while transforming it from normal to neoplastic, will at the same time endow it with properties of stem cells (or *stem-cellness*).
- c) In the case of haematopoietic malignancies there is some evidence that the expression of surface markers (*e.g.* CD34, CD38) found in normal HSCs is retained in leukemic stem cells (LSC): however, this may not be always the case, and it may or it may not apply to tumors from other tissues.
- d) In many cases treatment of a tumor by chemotherapy and/or radiotherapy produces a massive reduction in tumor mass (satisfying criteria of a complete remission): in view of (a, iii) it is assumed that surviving cells are enriched in TSCs, which eventually cause a relapse, but this is not necessarily always the case.

- e) Whereas stem-cellness is, by definition, an intrinsic property of a cell, this notion does not imply that the environment is not important: on the contrary the physical surroundings, or *niche*, may be crucial to the fate of a TSC and its progeny just as it is for maintaining normal HSCs.

The existence of TSCs does not alter the fundamental paradigm whereby the transformation of a normal cell into a malignant cell results from a specific succession of somatic mutations; but it specifies further that Darwinian selection of somatic cells within the evolving tumor can operate only on cells that have long-term renewal potential.

Moreover, unlike with normal stem cells, the differentiation programme of TSCs may be disrupted in a variety of ways precisely because we are dealing with pathological cells.

Therefore it is not surprising that properties of TSCs may vary a great deal with respect to morphology, surface features, pattern of growth and biological behaviour in general.

**PROGRESSI NELLE TECNOLOGIE
E METODOLOGIE**

DNA-microarray e RT-PCR quantitativa

Pier Paolo Piccaluga, Maura Rossi, Anna Gazzola, Claudia Mannu, Maria Rosaria Sapienza, Antonella Laginestra, Clara Bertuzzi, Claudio Agostinelli, Maria Teresa Sista, Simona Righi, Carlo Sagramoso, Elena Sabattini, Francesco Bacci, Stefano A. Pileri

Laboratorio di Patologia Molecolare, Unità di Ematologia, Istituto di Ematologia e Oncologia Medica L.&A. Seràgnoli, Policlinico Sant'Orsola Malpighi, Università di Bologna

Microarray analysis: technical considerations

A microarray consists of numerous regularly spaced DNA probes immobilised on a solid surface. The transcript in the sample is labelled with a fluorescent dye and hybridised to the microarray. The fluorescent signal bound to the probe is a function of the concentration of the corresponding transcript. The probe on the array may be prepared off-line as cDNA or oligonucleotides and spotted on the solid surface (1). It may also be synthesised in situ using photolithographic technique or inkjet synthesis. The oligonucleotide probes may consist of individual long ones in the range of 50-70 base pairs or sets of short probes for each transcript such as the 25-base-pair-long probe sets in arrays manufactured by Affymetrix (Sanata Clara, CA). Most of the laboratories are now using oligonucleotide arrays prepared from a purchased library that is spotted by a robot on the microarray or simply pre-fabricated microarray from various companies.

The currently available commercial arrays are close to whole transcriptome coverage, and arrays that cover all the expressed exons are also available so that one can determine the expression of alternatively spliced forms of the gene in addition to the expression level of the total transcripts from that gene estimated often from 3' biased probes.

Each microarray experiment, therefore, generates a vast amount of data and requires sophisticated data management and analytical tools, many of which are now publically available (2) and (3). There is no single best tool for all purposes, and the appropriate tools for an experiment depend on the experimental design, the type of analysis that needs to be performed and the questions being addressed. It is beyond the scope of this article to have a detailed discussion of the analytical methods but the importance of validation needs to be stressed. Validation may be computational as in leave-one-out cross-validation (4). Important findings can be validated independently by specific measurements such as quantitative reverse

transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and specific conclusions can be validated by studying an independent series of patients. Assessing certain biological (e.g., genetic alterations) or clinical variables on the cases studied may provide further independent evaluation of the conclusions.

With tens of thousands of parameters measured in each sample, the number of tumour samples studied is comparatively small and generally insufficient for confident statistical conclusions. This discrepancy in dimensionality is an important reason why validation of the results and conclusions is so important in microarray experiments. While it may not be practical or possible to study thousands of cases, the number of cases included should be as large as possible since it is not feasible to have meaningful conclusions from a very limited number of cases even with sophisticated analysis.

Questions have been raised regarding the reliability and reproducibility of microarray experiments and the feasibility of cross-platform comparison of results. With improvement of microarray technology, especially with commercial microarrays, carefully performed studies with strictly controlled experimental procedures are highly reproducible using the same array platform (5). Cross-platform comparison is more challenging; however, a recent large multicentre study (5), examining a number of microarray platforms, has found that the results are reasonably comparable even across different platforms. It is now generally recognised that while there may be substantial variations in the measurement of individual transcripts, the comparison of different signatures represented by large groups of transcripts is much more robust. Therefore, many of the early concerns regarding the reliability and reproducibility of microarray analysis have now been addressed. Properly and carefully performed microarray experiments represent a useful approach for GEP.

GEP by sequencing of the transcriptome was not a practical approach a few years ago. However, with the development of high-throughput sequencing (6), and the marked reduction in the price and time required, it is now possible to perform expression profiling using this platform. There are certain significant advantages using this approach including the unbiased survey of all transcripts comprising different spliced isoforms, the ability to quantitate low-level transcripts and detection of mutations or polymorphisms that may have significant biological implications.

Impact of DNA microarrays on lymphoma diagnosis and classification

The diagnosis and classification of non-Hodgkin lymphoma is challenging, and there have been multiple classification systems proposed in the last 50 years. In 1966, Rappaport (7) established a widely used, morphologically based classification system that was followed later by the Lukes and Collins (8) and the Kiel classification (9). The latter two classification systems were based on the conceptual advance in immunology and incorporated the lineage of the lymphoma cell in the classification. The multiplicity of classifications led to an international effort that resulted in the Working Formulation (10) that was designed to provide a transla-

tion between the different widely used classification systems. An international group of haematopathologists later proposed the Revised European American Lymphoma (REAL) Classification that subsequently evolved into the World Health Organization (WHO) (11) classification that had broad consensus among the haematopathology community as well as the participation of the oncology community. Both the REAL and WHO classification systems emphasised the delineation of disease entities utilising all the available information, including morphology, immunophenotyping, molecular and cytogenetics data and clinical findings. Even with this much more refined classification system, the response to treatment and survival of patients within each specific lymphoma category shows significant variability, indicating that there is further biological heterogeneity not captured by the classification system.

Development of a lymphoma is initiated by a genetic alteration in a cell that predisposes the cell to undergo further genetic alterations (12). With time, the additional acquired abnormalities promote the development of a clone that has growth and/or survival advantage over other cells (13). This eventually will develop into a clinical lymphoma. The complement of genetic abnormalities in a tumour is a major determinant of the biology of the tumour and its clinical behaviour. The cumulative genetic abnormalities in a tumour will lead to unique gene expression profiles or signatures that can be determined experimentally by microarray analysis. Based on this assumption, it is logical to postulate that the characteristics of a tumour and its clinical behaviour can be predicted by the unique gene expression profile of the tumour. Therefore, gene expression profiling (GEP) studies may improve our diagnosis and classification of lymphomas. If GEP can identify important oncogenic pathways in the tumour, it would also help to direct therapy against these pathways that may result in more effective management of the tumour while at the same time with reduced toxicity (14).

Quantitative real time polymerase chain reaction

In molecular biology, real-time polymerase chain reaction, also called quantitative real time polymerase chain reaction (Q-PCR/qPCR), is a laboratory technique based on the PCR, which is used to amplify and simultaneously quantify a targeted DNA molecule. It enables both detection and quantification (as absolute number of copies or relative amount when normalized to DNA input or additional normalizing genes) of one or more specific sequences in a DNA sample. The procedure follows the general principle of polymerase chain reaction; its key feature is that the amplified DNA is detected as the reaction progresses in real time, a new approach compared to standard PCR, where the product of the reaction is detected at its end. Two common methods for detection of products in real-time PCR are: (15) non-specific fluorescent dyes that intercalate with any double-stranded DNA or cDNA, and (16) sequence-specific DNA probes consisting of oligonucleotides that are labelled with a fluorescent reporter which permits detection only after hybridization of the probe with its complementary DNA or cDNA target (15, 16).

Acknowledgements

AIRC (IG4987), PRIN/COFIN, FIRB, BolognAIL, Centro Interdipartimentale per la Ricerca sul Cancro “G. Prodi”, Fondazione CARISBO, Progetto Strategico d’Ateneo (Prof. SA Pileri/Dott. PP Piccaluga).

References

1. Saluz HP, Iqbal J, Gino VL, et al. Fundamentals of DNA-chip/array technology for comparative gene-expression analysis. *Curr Sci.* 2002; 83: 829-833.
2. Sherlock G. Analysis of large-scale gene expression data. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12 (2): 201-205.
3. BRB-ArrayTools user guide, version 3.6.0 Available from: <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>.
4. Simon R. Microarray-based expression profiling and informatics. *Curr Opin Biotechnol.* 2008; 19 (1): 26-29.
5. Shi L, Reid LH, Jones WD, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol.* 2006; 24 (9): 1151-1161.
6. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008; 26 (10): 1135-1145.
7. Rappaport H. Tumors of the hematopoietic system. *Atlas of tumour pathology. AFIP (1966) Section III.*
8. Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer.* 1974; 34 (4 Suppl): 1488-1503.
9. Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, et al. Updated kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1 1988; 8580: 292-293.
10. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer.* 1982; 49: 2112-2135.
11. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification: pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon, France. 2008.
12. Pearson PL, Van der Luijt RB. The genetic analysis of cancer. *J Intern Med.* 1998; 243 (6): 413-417.
13. Knudson AG. Hereditary predisposition to cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 833: 58-67.
14. Iqbal J, Liu ZF, Deffenbacher K, Chan WC. Gene expression profiling in lymphoma diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Haemat.* 2009; 22 (2): 191-210.
15. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* 2004; 44 (5): 619-626.
16. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006; 1 (3): 1559-1582.

Comparative genomic hybridization e single nucleotide polymorphisms su microarray (array CGH, SNP-array)

Francesco Pasquali

Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Sezione di Biologia e Genetica,
Università dell'Insubria, Varese

La *comparative genomic hybridization* (CGH) è una tecnica di citogenetica molecolare introdotta nel 1992 (Kallionemi et al., 1992) allo scopo di evidenziare nel DNA di una determinata popolazione cellulare la presenza di sequenze presenti in eccesso o in difetto, quindi, indirettamente, di tratti di cromosoma presenti in eccesso o in difetto a causa di anomalie sbilanciate. Ha dato risultati rilevanti soprattutto nello studio di anomalie clonali presenti nelle neoplasie. Le tecniche di analisi su *microarray* sono state anch'esse introdotte negli anni '90 del XX secolo per studiare l'espressione di geni in determinate popolazioni cellulari e sono state usate anch'esse principalmente nello studio di neoplasie (Alizadeh et al., 2000).

Sono illustrati i principi di queste due tecnologie e come nel primo decennio del XXI secolo mettendole in qualche modo insieme si siano ideate tecniche su *microarray* allo scopo di studiare non l'espressione genica, ma il DNA stesso, sfruttando l'ibridazione genomica comparata su *array* che contengono sequenze di DNA di controllo (di un soggetto sano) del DNA da studiare rispetto ad un DNA di controllo (Barrett et al., 2004); ovvero, con un principio un po' diverso dall'ibridazione comparativa, si è condotta l'ibridazione del DNA sotto studio con sequenze polimorfiche note, quali i *single nucleotide polymorphisms* (SNP) (Mei et al., 2000). Sono così state messe a punto le tecniche note rispettivamente come *array-CGH* e *SNP-array*.

Vengono illustrati i risultati che sono ottenibili con questi metodi: entrambi sono in grado di identificare sbilanciamenti di materiale cromosomico, con una risoluzione dei due metodi paragonabile e che è andata aumentando negli anni. La tecnica *SNP-array* inoltre è in grado di mettere in evidenza disomia uniparentale (*uniparental disomy - UPD*) che può dare luogo a perdita di eterozigotità (*loss of heterozygosity - LOH*): fenomeni che possono essere importanti soprattutto nelle indagini sulla variabilità genetica delle cellule neoplastiche (Hagenkord e Chang, 2009). Sono discussi alcuni aspetti metodologici rilevanti soprattutto per la patologia displastica/neoplastica e alcuni dei risultati più significativi ottenuti nello studio della patologia cromosomica costituzionale ed acquisita:

- sensibilità dei due metodi nell'identificazione di anomalie cromosomiche sbi-

lanciate, in relazione alla risoluzione lineare sul genoma disponibile e alle *Copy Number Variations (CNV)* o ai *Copy Number Polymorphisms* senza significato patologico diretto, ma che potrebbero peraltro esercitare un effetto su geni vicini, fino forse ad 1 Mb di distanza (Benko et al., 2009);

- sensibilità della *a-CGH* nell'identificazione di popolazioni cellulari con anomalia cromosomica sbilanciata, particolarmente in relazione ad anomalie presenti in patologia mielodisplastica e mieloproliferativa in cloni midollari di proporzioni ridotte, all'esordio e nel *follow-up* (Maserati et al., 2009a);
- risultati ottenuti nella Disabilità Intellettuale (DI) e nella Sindrome di Down (SD): come si sono modificate le conoscenze sull'incidenza delle anomalie cromosomiche causa di DI (Edelmann e Hirschhorn, 2009) e come si sia fatto un passo in avanti nella definizione dei meccanismi che portano ai sintomi della SD, in particolare al ritardo mentale (Lyle et al., 2009);
- risultati ottenuti in indagini su soggetti con anomalie cromosomiche sbilanciate costituzionali già identificate con analisi cromosomiche e ibridazione in situ fluorescente (*FISH*);
- risultati ottenuti in pazienti con leucemia acuta mieloide (LAM) con trisomia 8 (Paulsson et al., 2006), con implicazioni anche di valore prognostico;
- risultati ottenuti in pazienti con LAM con cariotipo normale alle analisi di *routine* (Tyybäkinoja et al., 2007): il quadro citogenetico attuale della LAM, in relazione ad inquadramento nosologico ed implicazioni prognostiche (Lo Coco et al., 2008; Gupta et al., 2008; Morra et al., 2009; Fernando et al., 2009);
- risultati in pazienti con sindromi mielodisplastiche (SMD) (Starczynowski et al., 2008; Gondek et al., 2008; Novak et al., 2009) ed implicazioni cliniche che ne derivano;
- risultati ottenuti in pazienti con sindromi mendeliane predisponenti a LAM/SMD (*Inherited bone marrow failure syndromes - IBMFS*), in particolare in soggetti affetti da Sindrome di Shwachman-Diamond (Maserati et al., 2009b);
- risultati in pazienti con anomalie cromosomiche acquisite clonali nel midollo senza evidenza di SMD, ma nei quali l'anomalia cromosomica porta ad un effetto genico che dà luogo a condizioni trombocitopeniche (trombocitopenia lieve - *Congenital Amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT)* - trombocitopenia tipo *Paris-Trousseau*);
- risultati nel monitoraggio della leucemia mieloide cronica (LMC), in relazione ad un metodo innovativo basato su dati di RT-PCR quantitativa sul DNA genomico midollare ed alla sua applicabilità nella *routine* utilizzando la *a-CGH* (Matarucchi et al., 2009);
- dimostrazione della necessaria interazione di tecniche di *a-CGH* e *SNP-array* con tecniche di citogenetica, ed in particolare di *FISH*, per l'ottenimento di risultati significativi e corretti.

Bibliografia

1. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000; 403: 503-511.

2. Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *PNAS*. 2004; 101: 17765-17770.
3. Benko S, Fantes JA, Amiel J, et al. Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nature Genet*. 2009; 41: 359-364.
4. Edlmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1151: 157-166.
5. Fernando PG, Silva IA, Morolli B, et al. Genome wide molecular analysis of minimally differentiated acute myeloid leukaemia. *Haematologica*. 2009; 94: 1546-1554.
6. Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, et al. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*. 2008; 111: 1534.
7. Gupta M, Raghavan M, Gale RE, et al. Novel regions of acquired uniparental disomy discovered in acute myeloid leukaemia. *Genes Chromos Cancer*. 2008; 47: 729-739.
8. Hagenkord JM, Chang CC. The rewards and challenges of array-based karyotyping for clinical oncology applications. *Leukemia*. 2009; 23: 829.
9. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992; 258: 818-821.
10. Lo Coco F, Cuneo A, Pane F, et al. Prognostic impact of genetic characterization in the GIMEMA LAM99P multicenter study for newly diagnosed acute myeloid leukaemia. *Haematologica*. 2008; 93: 1017-1024.
11. Lyle R, Béna F, Gagos S, et al. Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17: 454-466.
12. Maserati E, Valli R, Marletta C, et al. Array-CGH used to monitor dysplastic/neoplastic disorders with unbalanced chromosome anomalies may detect as low as 8% abnormal cells. 7th European Cytogenetics Conference, Stockholm, July 4-7, 2009, Abstracts, *Chromosome Res*. 2009a; 17 (Suppl 1): S140-141.M.
13. Maserati E, Pressato B, Valli R, et al. The route to development of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukaemia in Shwachman-Diamond syndrome: the role of ageing, karyotype instability, and acquired chromosome anomalies. *Br J Haematol*. 2009b; 145: 190-197.
14. Mattarucchi E, Spinelli O, Rambaldi A, et al. Molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukemia by genomic DNA compared with conventional mRNA analysis. *J Mol Diagn*. 2009; 11: 482-487.
15. Mei R, Galipeau PC, Prass C, et al. Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome Res*. 2000; 10: 1126-1137.
16. Morra E, Barosi G, Bosi A, et al. Clinical management of primary non-acute

- promyelocytic leukaemia acute myeloid leukaemia: practice Guidelines by the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2009; 94: 102-112.
17. Nowak D, Nolte F, Mossner M, et al. Genome-wide DNA-mapping of CD34+ cells from patients with myelodysplastic syndrome using 500K SNP arrays identifies significant regions of deletion and uniparental disomy. *Exp Hematol*. 2009; 37: 215.
 18. Paulsson K, Heidenblad M, Strombeck B, et al. High-resolution genome-wide array-based comparative genomic hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as sole cytogenetic aberration. *Leukemia*. 2006; 20: 840-846.
 19. Starczynowski DT, Vercauteren S, Telenius A, et al. High-resolution whole genome tiling path array CGH analysis of CD34+ cells from patients with low-risk myelodysplastic syndromes reveals cryptic copy number alterations and predicts overall and leukemia-free survival. *Blood*. 2008; 112: 3412.
 20. Tyybäkinoja A, Elonen E, Piippo K, et al. Oligonucleotide array-CGH reveals cryptic gene copy number alterations in karyotypically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2007; 21: 571-574.

Ruolo della citometria nella caratterizzazione fenotipica e nell'isolamento delle cellule staminali tumorali

Guido Pagnucco¹, Massimo Geuna², Giuseppe Carrubba³, Francesco Gervasi¹

¹U.O.C. Ematologia con TMO, Dipartimento di Oncologia, ARNAS Civico-Benfratelli-Di Cristina, Palermo;

²Laboratorio Immunopatologia, Anatomia Patologica, Ospedale Mauriziano Umberto I, Torino;

³U.O.S. Oncologia Sperimentale, Dipartimento di Oncologia, ARNAS Civico-Benfratelli-Di Cristina, Palermo

Introduzione

I progressi nel campo della biologia delle cellule staminali, cellule staminali tumorali comprese, sono stati a lungo ostacolati da difficoltà nella loro identificazione, isolamento e caratterizzazione. Inizialmente la popolazione delle cellule staminali poteva infatti essere definita solo in base a due caratteristiche biologiche specifiche: capacità di automantenimento e potenziale differenziativo multilineare. Solo recentemente le cellule staminali tumorali e quelle di una serie di tessuti normali sono state identificate e isolate. Ciò è stato reso possibile principalmente dalla individuazione di marcatori specifici sia delle cellule staminali tumorali che di quelle normali. L'identificazione e l'isolamento, in differenti tumori, di putative popolazioni di cellule staminali sono stati ottenuti impiegando tali marcatori con l'ausilio della citometria a flusso multiparametrica e del *cell sorting* e dimostrando, con la metodica dello xenotrapianto in topi NOD-SCID, che specifiche sottopopolazioni sono in grado di generare tumori trapiantabili in passaggi seriali e linee cellulari multiple, che riproducono le caratteristiche istopatologiche del tumore originario.

Marcatori per l'identificazione e l'isolamento delle cellule staminali tumorali

L'individuazione di una serie di marcatori cellulari espressi dalle cellule staminali normali in differenti tessuti è stata in genere il punto di partenza per l'identificazione e la separazione delle relative cellule staminali tumorali. La lista di tali marcatori (Tab. 1) comprende:

1. una serie di antigeni cellulari (CD44, CD24, CD133, ESA, B1, CD138, CD34, CD166, CD20);
2. l'efflusso dei coloranti nucleari Hoechst e Rodamina identificante la cosiddetta *side population* (SP);
3. l'aldeide deidrogenasi (ALDH1).

È importante sottolineare che i marcatori individuati con tale approccio hanno alcune limitazioni:

1. non consentono di identificare sempre in modo univoco le cellule staminali di un determinato tumore, in quanto anche cellule non esprimenti tali marcatori possono avere un potenziale tumorigenico e clonogenico;
2. possono individuare sottopopolazioni genericamente arricchite di cellule con potenzialità tumorigeniche e clonogeniche e non cellule staminali tumorali;
3. possono essere l'espressione di una modulazione antigenica determinata da fattori a cui le cellule tumorali sono esposte durante le complesse procedure di isolamento, comprendenti disaggregazione meccanica ed enzimatica del tumore di origine, e dalle condizioni di crescita in cultura.

L'isolamento delle cellule staminali tumorali è sempre una sfida, anche lavorando nelle migliori condizioni con marcatori sicuramente accertati e stabilmente espressi. Considerata la piccola frazione di cellule staminali presenti nel tumore va infatti studiata una grande massa di cellule per ottenere un numero sufficiente di cellule staminali tumorali. Inoltre le frazioni cellulari "negative" per un determinato marcatore devono essere particolarmente pure, in quanto anche piccole frazioni di cellule staminali contaminanti possono compromettere i risultati degli esperimenti di xenotrapianto. Per ogni campione e fonte di campione, in considerazione della diversità dei tumori analizzati, deve essere definita l'appropriata metodologia di isolamento e le strategie di "*labeling e gating*" in citometria a flusso multiparametrica devono essere ottimizzate individualmente, includendo l'uso di appropriati controlli positivi e negativi (1, 2).

Tab. 1 - Marcatori impiegati per identificare e isolare cellule staminali da vari tumori umani.

Marcatori delle cellule staminali

Tumore	CD44	CD24	CD133	ESA	B1	CD138	CD34	CD166	CD20	SP	ALDH1
Mammella	+	-	+	+	+					+	+
Colon	+		+	+				+			+
Prostata	+		+		+					+	+
Pancreas	+	+	+	+							+
Testa e collo	+										
Cervello			+								
Polmone			+								
Fegato			+								
Melanoma			+						+	+	
Mieloma						-	+		+	+	+
Leucemia							+			+	+

CD44, p-glicoproteina 1; CD24, heat stable antigen; CD133, prominina1; ESA, epidermal surface antigen (Flotillina/2); B1, integrin B1 chain; CD138, heparin sulphate proteoglycan fibroblast growth factor receptor (syndecan proteoglycan 1); CD34, hematopoietic progenitor cell antigen (GP105-120); CD166, activated leukocyte cell adhesion molecule; CD20, B-lymphocyte cell-surface antigen B1; SP, side population (Hoechst); ALDH1, aldeide deidrogenasi 1A1.

Fenotipo delle cellule staminali tumorali

Leucemia mieloide acuta. La presenza di cellule staminali leucemiche è stata per la prima volta dimostrata nel 1997, nell'ambito della frazione CD34+CD38-, mediante *cell sorting* in citometria a flusso e xenotrapianto in topi NOD/SCID, in una serie di casi con leucemia mieloide acuta, riproducendo nel topo i *pattern* clinici e la gerarchia intraclonale della leucemia osservata nell'uomo (3, 4).

Cancro della mammella. L'esistenza di cellule staminali tumorali nei tumori solidi è stata per la prima volta dimostrata nel cancro della mammella con un approccio simile a quello impiegato per la leucemia mieloide acuta, impiegando i marcatori CD44 (recettore cellulare ligando di differenti proteine della matrice cellulare) e CD24 (proteina ancorata al GPI con funzioni regolatorie negative del recettore CXCR4), entrambi coinvolti nelle funzioni di adesione cellulare e implicati nel processo che porta alla generazione delle metastasi, e la molecola di adesione cellulare epiteliale EpCAM conosciuta anche come ESA (*epithelial-specific antigen*) (5). In topi NOD/SCID piccole aliquote di cellule con fenotipo CD44+/CD24^{low}/ESA^{low} (selezionate negativamente per otto marcatori di linea al fine di eliminare cellule non epiteliali) sono state in grado di generare tumori, al contrario di aliquote 100 volte superiori di cellule a fenotipo CD44+/CD24+ (6). Tale fenotipo è risultato più frequente in tumori della mammella ad istologia basocellulare e strettamente associato ai tumori della mammella ereditari BRCA1, ma non è risultato correlato con fattori riconosciuti importanti per l'*outcome* clinico, come taglia tumorale, entità dell'interessamento linfonodale e frazione di cellule in fase S del ciclo cellulare (7). Questi dati, considerata la rilevante presenza di cellule a fenotipo CD44+/CD24- nello strato basale dell'epitelio mammario normale, suggeriscono che i carcinomi della mammella a cellule basali possono originare da progenitori normali con tale fenotipo. Tale ipotesi trova ulteriore riscontro nel recentemente identificato ruolo svolto da BRCA1 nella differenziazione dei lumi ghiandolari della ghiandola mammaria (8). L'impiego di altri marcatori delle cellule staminali tumorali come ALDH1, la cui presenza è stata rilevata in circa il 30% dei tumori della mammella, ha consentito di selezionare nella popolazione CD44+/CD24-/lin- una frazione con alto potenziale tumorigenico, a fenotipo ALDH1+/CD44+/CD24-, capace di generare tumori a partire dallo xenotrapianto di 20 cellule (9). Tale fenotipo, a differenza di quello CD44+/CD24-/lin-, è risultato correlare con l'*outcome* clinico e con alcune caratteristiche istopatologiche di significato prognostico come grado tumorale, espressione di HER2 e di Ki67, ma non è risultato associato ad un particolare sottotipo molecolare di carcinoma della mammella. Recentemente il CD133 è stato identificato come marcatore di una differente sottopopolazione di cellule staminali tumorali con fenotipo distinto da quella CD44+/CD24-, uguale potenziale tumorigenico ma sovrapposizione tra le caratteristiche fenotipiche delle rispettive progenie (10).

Cancro del colon-retto. Le cellule staminali gastro-intestinali normali sono state estesamente studiate per il loro ruolo nella generazione e nella funzione delle cripte del colon (11). Le cellule di origine del cancro del colon-retto sono state inizialmente identificate in una frazione cellulare che rappresenta circa il 2,5%

delle cellule tumorali ed esprime l'antigene CD133, una proteina transmembrana espressa anche dai progenitori emopoietici CD34+ con un probabile ruolo nell'organizzazione della membrana citoplasmatica (12). Con l'impiego del CD44 e della molecola di adesione cellulare epiteliale EpCAM conosciuta anche come ESA (*epithelial-specific antigen*) è stato possibile identificare e separare una frazione cellulare a fenotipo CD44+/ESA+ in grado di generare tumori a partire dallo xenotrapianto di 100 cellule (13). Nell'ambito di tale frazione è stata identificata una sottopopolazione a fenotipo CD166+, un marcatore delle cellule staminali mesenchimali i cui livelli di espressione in pazienti con cancro del colon-retto sono stati associati ad una peggiore prognosi, con maggiore potenziale tumorigenico. CD166 è stato inoltre individuato come marcatore utilizzabile nella separazione di cellule staminali tumorali del cancro del colon-retto in modo indipendente e/o sinergico rispetto a CD44 (14).

Cancro della prostata. Cellule staminali normali della prostata esprimono l'integrina $\alpha 2\beta 1$ e citocheratine di tipo basale sono presenti nel compartimento basale dell'epitelio prostatico, esprimono CD133 e non esprimono recettori per gli androgeni (15). Cellule tumorali dotate di capacità tumorigeniche e di autorinnovamento sono state isolate da tumori primitivi della prostata, e successivamente da linee cellulari e xenotrapianti, nella frazione CD44+/CD133+/ $\alpha 2\beta 1$ high (16-19). Tale sottopopolazione rappresenta lo 0,1% circa della popolazione tumorale totale.

Carcinoma del pancreas. Nel carcinoma del pancreas, utilizzando una metodologia basata sull'impiego degli antigeni CD44, CD24 ed ESA, come per il carcinoma della mammella, è stato possibile identificare una frazione cellulare, presente nello 0,2-0,8% delle cellule tumorali, a fenotipo CD44+/CD24+/ESA+, con elevato potenziale tumorigenico e capacità di riprodurre il tumore primitivo in esperimenti di xenotrapianto (20). Anche l'antigene CD133, presente nell'1-3% delle cellule ottenute da adenocarcinomi del pancreas e in grado (sia nei tumori primitivi che nelle linee cellulari) di discriminare frazioni cellulari ad elevata attività proliferativa, è stato identificato come marcatore delle cellule staminali tumorali (21, 22). In tale studio è stata inoltre rilevata una sovrapposizione del 14% tra il fenotipo CD133+ e quello CD44+/CD24+/ESA+ facendo ipotizzare anche in questo tumore la presenza di più di un tipo di cellule staminali tumorali. Inoltre nella frazione infiltrante dei tumori pancreatici le cellule staminali tumorali CD133+ sono risultate coesprimere in parte CXCR4. Sia la frazione CD133+CXCR4+ che quella CD133+CXCR4- sono risultate in grado di generare il tumore primitivo ma solo la frazione CD133+CXCR4+ erano capaci di dar luogo a metastasi.

Carcinoma squamocellulare di testa e collo. In tale tipo di tumore è stato individuata una frazione cellulare CD44+, costituente generalmente meno del 10% delle cellule tumorali, con elevato potenziale tumorigenico e capacità di riprodurre il tumore primitivo in esperimenti di xenotrapianto (23). Tali cellule sono prevalentemente cellule basali che colocalizzano in *microdomains* dello stroma del tumore con cellule esprimenti BMI-1, un gene correlato all'automantenimento delle cellule staminali (24).

Medulloblastoma. Molto rimane da definire riguardo alle correlazioni tra il medulloblastoma e le cellule staminali che danno origine ai tumori cerebrali embrionali. Ma vi sono evidenze che almeno alcuni di questi tumori traggono origine da cellule staminali o sottopopolazioni di progenitori normali CD133+ ed esprimono la molecola di segnale intracellulare nestina, e che le stesse vie di segnale richieste in queste sottopopolazioni non neoplastiche siano frequentemente attivate nei tumori cerebrali embrionali (25-28).

Carcinoma del polmone. La presenza di una popolazione clonogenica in tumori polmonari è stata descritta più di 25 anni fa (29). Solo recentemente, utilizzando il *cell sorting* della *side population* (SP) di campioni ottenuti da carcinomi polmonari a piccole cellule e da linee cellulari, è stato dimostrato che all'interno di tale sottopopolazione una piccola frazione cellulare possiede caratteristiche di cellule staminali (30). Tuttavia tutti gli sforzi per individuare un marcatore fenotipico specifico, al fine di isolare le cellule staminali dei tumori polmonari, utilizzando una serie addizionale di marcatori fenotipici (CD24, CD34, CD44 e nestina), sono risultati vani, considerata l'impossibilità di differenziare la SP e la non-SP in base alle relative espressioni fenotipiche (31). Recentemente è stata infine identificata sia nei tumori a piccole cellule che negli adenocarcinomi una popolazione CD133+ con caratteristiche clonogeniche *in vitro* e in grado di generare tumori *in vivo* (32).

Epatocarcinoma. Negli epatocarcinomi la presenza di cellule con alcune delle caratteristiche attribuite alle cellule staminali è stata dimostrata, ma non sono stati ancora individuati marcatori specifici e le cellule staminali del cancro del fegato non sono ancora state isolate (33).

Melanoma. La caratterizzazione biologica e molecolare delle cellule staminali del melanoma è ancora agli inizi e l'origine di tali cellule deve ancora essere determinata (34). Solo recentemente sono stati descritti l'espressione di marcatori fenotipici specifici in grado di individuare cellule con potenziale tumorigenico: CD133, CD20 e *side population* (35, 36). Tra questi il CD133 si è dimostrato un marcatore consentente, nel melanoma metastatico, la separazione di una frazione cellulare in grado di riprodurre il tumore primitivo in esperimenti di xenotrapianto (37).

Mieloma. Le plasmacellule del mieloma derivano da cellule B clonotipiche mature, rilevabili con varia frequenza nel sangue e nel midollo, generate nel compartimento maturativo B linfocitario che segue la formazione dei centri germinativi (38). Studi genetici, immunofenotipici e funzionali hanno dimostrato che queste cellule sono equivalenti a cellule B memoria, con fenotipo CD19+/CD27+/CD38-/138-. Lo xenotrapianto in topi NOD/SCID di tali cellule, ma non di plasmacellule CD138+, ha riprodotto i *pattern* clinici e la gerarchia intraclonale del mieloma di origine (39, 40). Ciò contrasta con quanto osservato in xenotrapianti utilizzando topi NOD/SCID impiantati con frammenti ossei umani o di coniglio, nei quali le plasmacellule CD138+ direttamente trapiantate nel frammento osseo ectopico sono state in grado di proliferare e di essere ritrapiantate in recipienti secondari, al contrario di quanto osservato per i precursori CD138- (41). Le ragioni di questo differente comportamento non sono chiare e si ritiene dipenda-

no dai diversi modelli di xenotrapianto utilizzati. Una recente ulteriore dimostrazione che le cellule B clonotipiche mature circolanti rappresentano le cellule staminali del mieloma è stata ottenuta con l'impiego della *side population* (Hoechst) e dell'*Aldefluor assay* per l'evidenziazione dell'ALDH1 (42).

Bibliografia

1. Zuba-Surma EK, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Small stem cells in adult tissues: very small embryonic-like stem cells stand up! *Cytometry Part A*. 2009; 75A: 4-13.
2. Cammareri P, Lombardo Y, Francipane MG, Bonventre S, Todaro M, Stassi G. Isolation and culture of colon cancer stem cells. *Methods Cell Biol*. 2008; 86: 311-324.
3. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997; 3: 730-737.
4. Dick JE. Stem cells concepts renew cancer research. *Blood* 2008; 112: 4793-4807.
5. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 3983-3988.
6. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, et al. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 1154-1159.
7. Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R53.
8. Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, et al. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 1680-1685.
9. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555-567.
10. Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, et al. BRCA1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*. 2008; 10: R10.
11. Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 2828-2838.
12. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon cancer-initiating cells. *Nature*. 2007; 445: 111-115.
13. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-110.
14. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 10158-10163.
15. Collins AT, Habib FK, Maitland NJ, et al. Identification and isolation of

- human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci.* 2001; 114: 3865-3872.
16. Richardson GD, Robson CN, Lang SH, et al. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci.* 2004; 117: 3539-3545.
 17. Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 10946-10951.
 18. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Highly purified CD44(+) prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene.* 2006; 25: 1696-1708.
 19. Maitland NJ, Collins AT. Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2862-2870.
 20. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 1030-1037.
 21. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007; 1: 313-323.
 22. Lee CJ, Dosch J, Simeone DM. Pancreatic cancer stem cells. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2806-2812.
 23. Prince ME, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2871-2875.
 24. Park I, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest.* 2004; 113: 175-179.
 25. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63: 5821-5828.
 26. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432: 396-401.
 27. Fan X, Eberhart CG. Medulloblastoma stem cells. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2821-2827.
 28. Dirks PB. Brain tumour stem cells: bringing order to the chaos of brain cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2916-2924.
 29. Carney DN, Gazdar AF, Bunn PA Jr, et al. Demonstration of the stem cell nature of clonogenic tumor cells from lung cancer patients. *Stem Cells.* 1982; 1: 149-164.
 30. Ho MM, Ng AV, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 4827-4833.
 31. Peacock CD, Watkins DN. Cancer stem cells and the ontogeny of lung cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2883-2889.
 32. Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008 15: 504-514.
 33. Sell S, Leffert HL. Liver cancer stem cells. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2800-2805.
 34. Zabierowsky SE, Herlyn N. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2890-2894.
 35. Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, et al. Melanoma contains CD133 and

- ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur J Cancer*. 2007; 43: 935-946.
36. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*. 2005; 65: 9328-9337.
37. Grichnik JM, Burch JA, Schulte RD, et al. Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *J Invest Dermatol*. 2006; 126: 142-153.
38. Huff CA, Matsui W. Multiple Myeloma cancer stem cells. *J Clin Oncol*. 2008. 26: 2895-2900.
39. Pilarski LM, Hipperson G, Seeberger K, et al. Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease: Engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice. *Blood*. 2000; 95: 1056-1065.
40. Matsui W, Huff CA, Wang Q, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004; 103: 2332-2336.
41. Yata K, Yaccoby S. The SCID-rab model: a novel in vivo system for primary human myeloma demonstrating growth of CD138-expressing malignant cells. *Leukemia*. 2004; 18: 1891-1897.
42. Matsui M, Wang K, Barber JP, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res*. 2008; 68 (1): 190-197.

Coltura di cellule staminali pluripotenti

Silvia Garagna¹, Paola Rebuzzini¹, Valeria Merico¹, Chiara Vasco¹,
Maurizio Zuccotti², CarloAlberto Redi³

¹Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Pavia

²Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Parma

³Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Le cellule staminali sono presenti in tutti gli organi e sono essenziali per il mantenimento dell'omeostasi tissutale. Queste cellule sono in grado di autorinnovarsi e di differenziarsi in un unico tipo cellulare, come ad esempio gli spermatozoni (cellule staminali unipotenti) che danno origine esclusivamente a spermatozoi, o a più tipi cellulari, come ad esempio le staminali ematopoietiche che danno origine a molteplici tipi cellulari differenziati e pertanto denominate "multipotenti". A queste si aggiungono le cellule staminali dette pluripotenti che presentano, oltre alle caratteristiche sopra citate, una grande capacità proliferativa e plasticità differenziativa.

Cellule staminali pluripotenti (Fig. 1) sono le cellule embrionali staminali (ES), derivate dalla massa cellulare interna (ICM) dell'embrione preimpianto, le germinali embrionali (EG), presenti nell'embrione alla terza settimana di sviluppo,

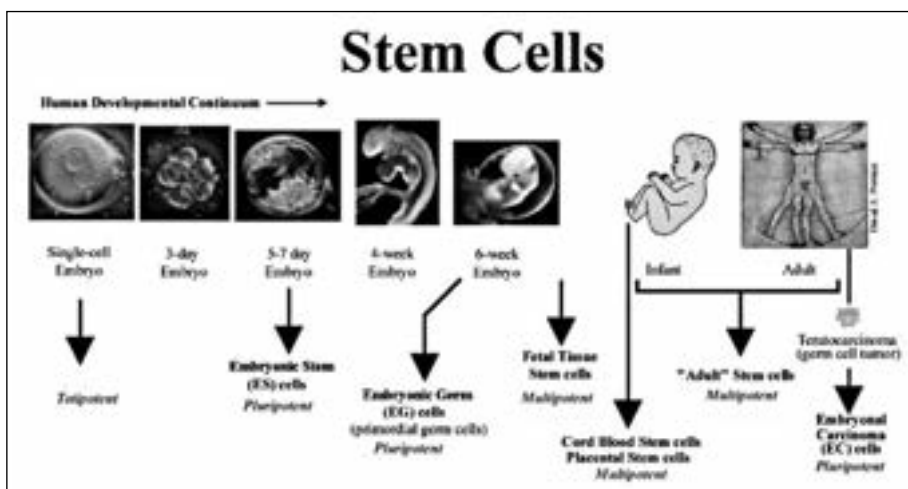


Fig. 1 - Fonti di cellule staminali e loro plasticità differenziativa.

quelle del carcinoma embrionario (EC), derivate dai teratocarcinomi della linea germinale e le cellule identificate in alcuni tumori (ad esempio tumori del cervello, della mammella e del tessuto ematopoietico) oggi chiamate cellule staminali tumorali. Queste cellule costituiscono una sottopopolazione delle cellule del tumore ed hanno la capacità di iniziare una nuova crescita tumorale.

Storicamente, le procedure per coltivare le cellule staminali pluripotenti derivano dalle metodiche utilizzate per coltivare le cellule EC ottenute da teratocarcinomi sviluppati sperimentalmente in seguito a trapianto ectopico di cellule embrionali o da neoformazioni gonadiche che si sviluppano spontaneamente con notevole frequenza in alcuni ceppi di topo.

Di seguito, verranno descritte le procedure di isolamento e coltura delle cellule ES, EG, ES ed un esempio tra le cellule staminali tumorali.

Cellule embrionali staminali

La prima linea di cellule ES umane (hES) è stata derivata con successo nel 1998 (Thomson et al., 1998) ben 17 anni dopo l'ottenimento della prima linea di cellule ES di topo (mES) (Evans e Kaufman 1981; Martin, 1981) a causa della limitata disponibilità di blastocisti di buona qualità. Oggi, la maggior parte degli embrioni utilizzati per la ricerca deriva da embrioni ottenuti da programmi di fecondazione in vitro, inclusi quelli in sovrannumero o di scarsa qualità e quindi esclusi dall'uso clinico. Altre sorgenti per la derivazione di linee di cellule ES sono gli embrioni partenogenetici (Revazova et al., 2007), i singoli blastomeri (Chung et al., 2006), le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) (Takahashi et al., 2007) o gli embrioni ottenuti per trasferimento di nuclei di cellule somatiche in oociti enucleati (Wakayama et al., 2001).

Le cellule ES derivano, con l'eccezione delle iPS, dall'espansione *in vitro* della ICM dell'embrione allo stadio di blastocisti. I metodi utilizzati per l'isolamento della ICM sono immunochirurgico o meccanico. È possibile anche coltivare l'intero embrione, dopo rimozione della zona pellucida, e isolare le cellule dell'ICM man mano che queste si moltiplicano. L'immunochirurgia è stata sviluppata per studiare le prime fasi dello sviluppo embrionale ed è attualmente il metodo più utilizzato, garantendo delle ottime rese in tempi relativamente brevi. Una volta isolata la ICM viene coltivata su di un monostrato di fibroblasti (*feeder layer*) embrionali di topo (MEF) mitoticamente inattivi.

Tradizionalmente, le cellule mES sono coltivate su MEF, in terreno KO-DMEM addizionato di siero fetale bovino (FBS) al 20% ed in presenza di LIF (leukemia inhibitory factor) che contribuisce a mantenere le mES in uno stato indifferenziato.

La prima linea di cellule hES è stata ottenuta utilizzando le procedure sviluppate per la derivazione e coltura delle cellule mES. Tuttavia, sono immediatamente emerse delle importanti differenze tra le linee delle due specie. Infatti, le hES hanno una bassa efficienza di proliferazione quando dissociate a singola cellula e non necessitano dell'aggiunta di LIF nel mezzo di coltura.

Sebbene le cellule hES richiedano cure meticolose, tra cui la necessità di cam-

biare quotidianamente il terreno di coltura, di suddividere le colture ogni 4-6 giorni e occasionalmente di rimuovere le colonie differenziate, possono venire coltivate in grandi quantità, congelate e scongelate con una buona resa di sopravvivenza. L'auspicabile utilizzo, in futuro, delle cellule hES per scopi clinici ha indotto lo sviluppo di sistemi di coltura che siano ben definiti nelle loro componenti, riproducibili, e soprattutto che evitino qualsiasi possibile contaminazione di origine animale. A questo proposito, va infatti ricordato che l'uso dell'FBS e del *feeder layer* espone potenzialmente le hES all'infezione da parte di patogeni, in particolare virus e prioni, di specie diversa. Inoltre, sia l'FBS che il *feeder layer* contengono componenti non note che possono influire sul loro differenziamento. Sono quindi stati sviluppati metodi di coltura *feeder-* e *serum-free* sia per le ES di topo che umane. Così, le mES possono essere coltivate su gelatina, in terreno KO-DMEM, addizionato con il 20% di *serum replacement* (che sostituisce l'FBS) ed in presenza di LIF (Williams et al., 1988; Smith et al., 1988). In queste condizioni le cellule mES mantengono tutte le caratteristiche di staminalità. Al contrario, l'assenza di *feeder layer* non garantisce il mantenimento della staminalità delle cellule hES (Thomson et al., 1998) e pertanto è stato adottato l'uso di un *feeder layer* ottenuto da fibroblasti fetali umani, per evitare la contaminazione da patogeni eterospecifici (Amit et al., 2003). Alternativamente, è possibile crescere le hES su di una matrice di Matrigel in terreno condizionato, e cioè nel terreno derivato dalla coltura dei MEF (Xu et al., 2001), o più recentemente è stato possibile coltivarle nel solo terreno DMEM/F12 (1:1) in presenza di fattori di crescita tra i quali il più comune è il bFGF (Basic fibroblast growth factor) (Xu et al., 2005).

Un protocollo che prevede la derivazione e la coltura delle hES in totale assenza di siero e *feeder layer* animale è stato recentemente sviluppato da Ludwig et al. (2006) e prevede l'uso del terreno DMEM/F12 addizionato con albumina umana, bFGF e TGF- β 1 (transforming growth factor, beta1), LiCl, acido gamma-amino-butyrico e acido piperico (il terreno addizionato con le componenti citate viene chiamato mTeSR). La matrice su cui vengono fatte crescere le cellule è costituita da una combinazione di collagene, fibronectina e laminina, tutte di origine umana. Le cellule così derivate possono essere coltivate in modo continuativo per diversi mesi mantenendo le caratteristiche di staminalità.

Un aspetto di criticità della coltura delle cellule ES, ma che coinvolge quasi ogni tipo cellulare, è la stabilità del cariotipo. Ad oggi un protocollo ottimale a questo fine non è stato ancora sviluppato, ma in generale, nel caso delle hES è stato messo in evidenza che il passaggio meccanico al momento della fase di sub-coltivazione è da preferirsi rispetto a quello enzimatico.

Cellule germinali embrionali

Le cellule germinali embrionali (EG) sono le cellule derivate dalla coltura *in vitro* delle cellule germinali primordiali (PGCs). Le PGCs sono cellule diploidi, precursori delle cellule germinali, che, migrando attraverso i territori embrionali, raggiungono le creste genitali dove, insieme alle cellule somatiche daranno origi-

ine alle gonadi. Le PGCs sono cellule irreversibilmente destinate a diventare cellule germinali. Nel feto le PGCs originano nel margine prossimale dell'epiblasto a 6.5 dpc (days post coitum), vicino alla giunzione con l'ectoderma extraembrionale, dopodiché (7.5 dpc) migrano nel mesoderma extraembrionale e nella parte posteriore della stria primitiva vicino alla base dell'allantoide. Circa 10 dpc, giungono in prossimità delle creste genitali e, nel corso della migrazione si dividono mitoticamente: da circa 150 cellule (8.5 dpc) si arriva a circa 25000 (13.5 dpc). Una volta alloggiate nelle creste genitali, esse smettono di dividersi mitoticamente e prendono destini diversi a seconda del sesso del feto (Labosky et al., 1994).

Le condizioni di coltura specifiche per le EG promuovono sinergicamente la proliferazione e la sopravvivenza delle PGCs murine *in vitro* oltre il periodo in cui, *in vivo*, esse cesserebbero di dividersi.

La maggior parte degli studi sull'isolamento e la derivazione delle EG è stata effettuata in modelli animali quali il topo, poiché problemi etici da un lato e scarsità di materiale dall'altro non permettono facilmente l'ottenimento delle EG umane che possono essere derivate da feti alla terza settimana.

La finestra temporale entro la quale prelevare le PGCs per derivare le EG è piuttosto ristretta. Le PGCs sono infatti prelevabili da feti di età compresa tra i 10.5 e gli 11.5 dpc localizzate presso. Queste regioni sono prelevate mediante forcine sterili da ciascun feto, indipendentemente dal sesso, e sono ripulite dai resti del mesonefro e dei tessuti somatici.

Ogni cresta genitale è posizionata singolarmente in una goccia (0.5 ml) di Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) in una capsula petri alla quale sono aggiunti 20 μ L di collagenasi/disipasi (concentrazione finale 1 mg/ml). Con aghi sterili tutti i campioni sono sminuzzati e poi incubati a 37°C per 15 minuti. Con l'ausilio di una micropipetta ciò che resta delle creste genitali è disgregato ulteriormente fino a formare piccoli aggregati di cellule. Gli aggregati sono lavati in terreno fresco, preriscaldato, e poi trasferite in eppendorf e centrifugate a 2000 rpm per 5 minuti.

Il surnatante è rimosso e il pellet risospeso in 0.5 mL di Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) implementato con 4.5 g/l glucosio, 0.01 mM aminoacidi non essenziali, 2 mM glutamina, 50 mg/ml gentamicina, 15% FBS e 0.1 mM 2- mercaptoetanololo. Nelle colture primarie al medium vengono ulteriormente aggiunti: "soluble recombinant rat SF" 60 ng/ml, bFGF 20 ng/ml e LIF 20 ng/ml (Labosky et al., 1994). Le PGCs così ottenute sono piastrate su una *feeder-layer* di MEF e mantenute in incubatore a 37°C al 5% di CO₂. Dopo 48 ore, 250 μ L di terreno sono rimossi dalla superficie del pozzetto e sostituiti con terreno fresco. L'operazione è molto delicata poiché le colonie che si stanno formando tendono a staccarsi dal *feeder-layer*.

Dopo altre 48 ore, tutto il medium è rimosso e sostituito con terreno fresco. Questi passaggi sono ripetuti ogni due giorni sino al giorno 10 di coltura. Le colonie che si sono formate prendono ora il nome di cellule germinali embrionali e ognuna di queste è isolata con una micropipetta per avviare una linea cellulare. Queste linee cellulari sono mantenute vitali con passaggi manuali come

avviene per le cellule ES (Labosky et al., 1994). Le EG sono in grado di proliferare e di mantenersi allo stato indifferenziato e pluripotente. Esprimono marcatori della pluripotenza come la fosfatasi alcalina, Oct4, SSEA-1 e SOX-2.

Cellule staminali del carcinoma embrionale

I teratocarcinomi murini sono tumori maligni che si sviluppano spontaneamente nelle gonadi di alcuni ceppi di topi (Stevens, 1973; Stevens e Varnum, 1974), ma possono essere indotti sperimentalmente trasferendo embrioni (Stevens, 1970a) o le creste genitali fetali (Stevens, 1970b) in siti ectopici di altri topi. Dal punto di vista istologico, i teratocarcinomi contengono una grossa varietà di tipi cellulari differenziati, ma contengono anche una significativa popolazione di cellule indifferenziate. La componente indifferenziata, che viene definita carcinoma embrionale (embryonal carcinoma o EC) può essere isolata e mantenuta in coltura in modo continuo e può anche essere differenziata sia *in vitro* che *in vivo* (portando ancora alla formazione di teratocarcinomi). Le cellule EC sono pluripotenti, sono dotate di auto rinnovamento e sono in grado di differenziarsi dando origine ai derivati dei tre foglietti embrionali (Martin and Evans, 1975). Esse però mostrano un limitato potenziale differenziativo, non essendo in grado di svilupparsi in certi tipi cellulari, quali le cellule germinali, oltre ad essere in genere interessate da aberrazioni cromosomiche. La scoperta delle EC ha permesso di sviluppare i protocolli che hanno contribuito in maniera determinante alla successiva derivazione e mantenimento *in vitro* di linee cellulari pluripotenti (tra le quali le cellule ES).

La prima linea di EC venne derivata quasi 30 anni fa isolando dalle cellule che formavano teratocarcinoma quelle che presentavano una morfologia arrotondata e una caratteristica crescita ad aggregati.

Il primo punto che apparve chiaro fu che le cellule EC crescevano bene se co-coltivate in presenza di fibroblasti embrionali di topo, inattivati nella crescita. Storicamente due sono le linee di EC che sono state isolate e mantenute *in vitro*: la linea F9 e la linea P19. La linea F9 fu isolata a partire da un teratocarcinoma spontaneo, mentre la linea P19 fu isolata a partire da un tumore primario indotto dal trasferimento di un embrione a 7.5 giorni in un testicolo adulto di topo. Mentre la linea F9 cresce in presenza di un *feeder-layer* di MEF, la linea P19 cresce in assenza di un *feeder-layer*. Queste due linee cellulari vengono coltivate utilizzando un terreno di coltura ottimizzato per le cellule embrionali staminali, addizionato con FBS al 10%.

A tutt'oggi queste due linee di EC sono largamente utilizzate come modello per lo studio dell'embriogenesi dei mammiferi.

Recentemente, nuove tecniche sono state messe a punto per l'isolamento delle cellule EC da teratocarcinomi umani nei quali la frazione di cellule EC è circa del 2-3%. Partendo dal presupposto che le cellule indifferenziate umane esprimono dei caratteristici antigeni di superficie, tra i quali SSEA-3, Przyborski ha recentemente isolato le cellule EC indifferenziate dalla popolazione eterogenea del teratocarcinoma, utilizzando l'immunoseparazione con un anticorpo anti-SSEA-3 coniugato a biglie magnetiche ("magnetic cell sorting" o MACS) (Przyborski, 2001).

Cellule staminali tumorali

Il problema più importante che la ricerca oncologica deve attualmente affrontare è l'identificazione del tipo cellulare capace di iniziare e sostenere la crescita del tumore. Recenti studi hanno evidenziato che all'interno in molti tipi di tumore sono identificabili due popolazioni, con caratteristiche fenotipiche chiaramente distinguibili. Una di queste due popolazioni, che rappresenta solo una limitata percentuale dell'intera massa tumorale, si presenta dedifferenziata e possiede delle caratteristiche che la rendono molto simile alle cellule staminali; per tale motivo sono state denominate cellule staminali tumorali (cancer stem cells, CSC). Studi effettuati sui tumori del sistema nervoso centrale hanno evidenziato che la popolazione di CSC è la responsabile della resistenza degli stessi tumori ai trattamenti radioterapici e della rigenerazione della massa tumorale dopo asportazione chirurgica (Bao et al., 2006; Altaner, 2008).

La prima significativa evidenza dell'esistenza delle CSC è venuta dallo studio di tumori ematologici ed stata pubblicata sulla rivista Nature Medicine nel 1997. Il trapianto di cellule leucemiche umane in topi NOD/SCID immunodepressi ha permesso per la prima volta di isolare cellule staminali di leucemia acuta mieloide (LAM) umana, chiamate SCID leukemia-initiating cells (SL-ICs), le quali sono la frazione che esprime il marcatore di superficie CD34, ma non il marcatore CD38. Queste cellule CD34⁺CD38⁻ rappresentano lo 0,1-1% dell'intera popolazione leucemica.

Le frazioni di cellule CD34⁻ e CD34⁺CD38⁺, che costituiscono la maggior parte della massa leucemica, non contengono le SL-ICs, sebbene contengano progenitori leucemici clonogenici capaci di accrescersi *in vitro* (Bonnet e Dick, 1997). Studi recenti hanno individuato e descritto le CSC anche in numerosi tumori solidi, suggerendo la possibilità che tali cellule siano alla base di un gran numero di neoplasie (Ailles e Weissman, 2007).

Ad oggi, è possibile identificare ed isolare le CSC con relativa facilità. Le CSC possono essere identificate sia funzionalmente, ovvero per la loro capacità clono-

Tab. 1 - Marcatori di superficie identificati in alcuni tipi di cellule staminali tumorali umane (modificata da Ailles e Weissman, 2007).

Tipo di tumore	Marcatori di superficie						Frazione % di CSC nel tumore
	CD133	CD44	CD24	CD34	CD38	CD117	
Glio- e Neuroblastoma	+						0,3-25,1%
Cancro della prostata	+						nd*
Cancro del colon	+						0,002%
Cancro del polmone	+						5-30%
Carcinoma epatico	+						nd
Cancro della mammella		+	-				nd
Cancro dell'ovario		+				+	0,2%
Cancro del pancreas		+	+				0,2-0,8%
Carcinoma testa-collo		+					<10%
Leucemia mieloide acuta				+	-		0,1-1%

*nd: non disponibile

genica, di autorinnovamento e di differenziazione verso tipi cellulari diversi, ma soprattutto fenotipicamente, ovvero sulla base dell'espressione di marcatori, che sono tipici delle cellule staminali del tessuto normale corrispondente (Tab. 1).

Nell'ambito dei tumori solidi, le CSC sono state identificate in molti di essi e sono oggi disponibili protocolli standardizzati sia per il loro isolamento che per la loro successiva propagazione *in vitro*.

Un ottimo esempio per spiegare la procedura di isolamento delle CSC sono i glioblastomi, nei quali la componente staminale tumorale rappresenta circa lo 0,3-3% dell'intera massa tumorale. Ad oggi il più efficiente protocollo di isolamento, con una purezza della popolazione del 97%, sfrutta la presenza dei marcatori antigenici presenti sulle cellule staminali tumorali e applica le stesse condizioni di coltura *in vitro* utilizzate per le cellule staminali normali della componente sana del tessuto. Le CSC sono quindi isolate a partire da una biopsia, ma la stessa procedura si applica anche nel caso l'isolamento avvenga a partire da linee cellulari commerciali, che viene disgregata a singola cellula utilizzando procedure enzimatiche o meccaniche. Le cellule isolate vengono quindi poste in coltura in terreno DMEM-F12 ad una concentrazione finale di 10^8 cellule/ml e lasciate proliferare per un tempo compreso tra i 7 e i 10 giorni. Dalla coltura così generata, le cellule vengono di nuovo dissociate completamente e le CSC vengono separate dalla popolazione eterogenea o mediante MACS o mediante "fluorescence-activated cell sorting" (FACS), utilizzando appropriati anticorpi anti-CD133. Le cellule CD133⁺ così isolate vengono poste in coltura in un terreno ottimizzato per crescita delle cellule staminali neuronali adulte, costituito da DMEM-F12 (N₂ supplemented), addizionato con penicillina e streptomicina, 20 ng/ml di EGF (human recombinant epidermal growth factor) e 20 ng/ml di bFGF (human recombinant basic fibroblast growth factor). Dopo 3-4 settimane di coltura si formano delle caratteristiche neurosfere, che possono essere mantenute in coltura indefinitivamente.

La verifica della staminalità delle CSCs isolate viene effettuata effettuando dei saggi di tumorigenicità e cioè iniettando nello spazio intracranico una piccola frazione di cellule CD133⁺. Ci si attende che le cellule iniettate siano in grado di rigenerare il tumore. In breve, il saggio consiste nel trapiantare nel cervello di topi immunodeficienti circa 100 cellule CD133⁺ e 10^5 cellule CD133⁻ ottenute dallo stesso glioma. Dopo circa 2 settimane viene valutata la rispettiva capacità di rigenerare *in vivo* il glioblastoma.

Bibliografia

1. Ailles LE, Weissman IL. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18 (5): 460-466.
2. Altaner C. *Neoplasma* 2008; 55: 369-374.
3. Amit M, et al. *Biol Reprod* 2003; 68: 2150-2156.
4. Bao S, et al. 2006; 444: 756-760.
5. Bonnet D, Dick JE. *Nat Med.* 1997; 3: 730-737.
6. Chung Y, et al. *Nature.* 2006; 439: 216-219.
7. Evans MJ, Kaufman MH. *Nature.* 1981; 292: 154-156.

8. Labosky PA, et al. *Development*. 1994; 120: 3197-3204.
9. Ludwig TE, et al. *Nat Biotechnol*. 2006; 24: 185-187.
10. Martin GR. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78: 7634-7638.
11. Martin GR, Evans MJ. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72: 1441-1445.
12. Przyborski SA. *Stem Cells*. 2001; 19: 500-504.
13. Revazova ES, et al. *Cloning Stem Cells*. 2007; 9: 432-449.
14. Smith AG, et al. *Nature*. 1988; 336: 688-690.
15. Stevens LC. *Dev Biol*. 1970a; 21: 364-382.
16. Stevens LC. *J Natl Cancer Inst*. 1970b; 44: 923-929.
17. Stevens LC. *J Natl Cancer Inst*. 1973; 50: 235-242.
18. Stevens LC, Varnum DS. *Dev Biol*. 1974; 37: 369-380.
19. Takahashi K, et al. *Cell*. 2007; 131: 861-872.
20. Thomson JA, et al. *Science*. 1998; 282: 1145-1147.
21. Wakayama T, et al. *Science*. 2001; 292: 740-743.
22. Williams RL, et al. *Nature*. 1988; 336: 684-687.
23. Xu C, et al. *Nat Biotechnol*. 2001; 19: 971-974.
24. Xu RH, et al. *Nat Methods*. 2: 2005; 185-190.

Modelli preclinici basati sull'impiego di cellule staminali

Lucia Ricci-Vitiani

Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Studi effettuati sulle leucemie mieloidi acute (1) hanno fornito le prime evidenze sperimentali circa l'organizzazione gerarchica delle cellule che costituiscono un tumore, individuando la presenza di una popolazione cellulare con caratteristiche di staminalità e dando l'avvio ad una serie di studi finalizzati a verificare l'esistenza di queste cellule nei tumori solidi.

Nell'ultimo decennio l'esistenza di una sottopopolazione di cellule tumorigeniche responsabile dell'insorgenza e del mantenimento del tumore è stata dimostrata per un certo numero di neoplasie solide, tra cui neoplasie del sistema nervoso centrale (2, 3) carcinoma della mammella (4), della prostata (5), del colon (6, 7) e del polmone (8). Queste cellule sono state denominate "cellule staminali tumorali" o "cellule inizianti il tumore" in quanto hanno dimostrato di avere un fenotipo indifferenziato, un potenziale proliferativo illimitato, la capacità di autorinnovarsi (*self-renewal*) e di dare origine ad una progenie eterogenea di cellule differenziate tipiche del tumore da cui sono state isolate.

L'identificazione delle cellule staminali tumorali (CST) ha profondamente influenzato l'approccio della ricerca oncologica nel tentativo di sviluppare terapie più efficaci nel trattamento dei tumori. Infatti, l'inefficacia delle terapie convenzionali nei confronti della popolazione staminale potrebbe spiegare la resistenza ai trattamenti e la tendenza a recidivare mostrate dalla maggioranza dei tumori. Pertanto, le cellule staminali tumorali rappresentano il bersaglio elettivo per nuovi farmaci ad azione mirata ed offrono un vantaggio potenzialmente rivoluzionario nel trattamento del cancro in quanto la loro eliminazione potrebbe portare all'eradicazione del tumore.

Nel nostro laboratorio, abbiamo sviluppato una tecnologia che ci ha permesso di isolare ed espandere *in vitro* cellule staminali tumorali da diverse neoplasie, tra cui il tumore del polmone e il tumore del colon-retto (6, 8). Da un punto di vista sperimentale, uno degli aspetti più rilevanti di tali cellule è il loro potenziale proliferativo illimitato, per cui possono essere mantenute in coltura per tempi indefiniti, ma anche il fatto che l'inoculo di un numero minimo di tali cellule in topi immunocompromessi è in grado di riprodurre fedelmente, sia da un punto di vista istologico che molecolare, il tumore del paziente da cui sono state prelevate.

Risulta evidente da quanto detto che le CST rappresentano dei modelli preclinici di valore inestimabile per la ricerca in campo oncologico e che il loro utilizzo per la sperimentazione di nuovi farmaci è più che mai auspicabile per la scoperta di nuovi e più efficaci terapie antineoplastiche.

Nel tumore al colon e nei tumori polmonari sono presenti cellule esprimenti l'antigene CD133

Diversi studi hanno dimostrato l'importanza del marcatore di superficie CD133 per l'identificazione e l'isolamento di cellule staminali normali e tumorali. Sulla base di queste evidenze, abbiamo analizzato la presenza di cellule esprimenti il marcatore CD133 in campioni di tessuto tumorale ottenuti chirurgicamente da pazienti con tumore al colon e diversi sottotipi di carcinoma polmonare. L'analisi immunocitochimica di sezioni ottenute dai suddetti reperti chirurgici ha evidenziato la presenza di una rara popolazione cellulare esprimente il CD133 in aree ad alta densità cellulare. Al contrario, nei tessuti di controllo, sia per il colon che per il polmone, le cellule CD133+ sono estremamente rare o assenti.

Sulla base di questi risultati abbiamo proceduto all'isolamento delle cellule tumorali esprimenti il CD133 sia dal tumore al colon che dal carcinoma polmonare, con procedure meccaniche ed enzimatiche. Questa metodica ci ha permesso di quantificare in maniera più precisa la percentuale di cellule tumorali CD133+. In entrambe le patologie, i valori confermano che, salvo alcune eccezioni, la percentuale di cellule esprimenti il CD133 è molto bassa (circa 2.5% nei tumori al colon e meno del 1% in gran parte dei carcinomi al polmone analizzati), ma costantemente più alta rispetto ai tessuti normali. Inoltre, l'espressione del CD133 è associata a quella dell'antigene Ep-CAM (epithelial cell adhesion molecule) suggerendo che l'aumento in percentuale delle cellule CD133+ nei tumori analizzati, rispetto ai corrispettivi tessuti normali, sia correlata all'aumento del numero di cellule epiteliali indifferenziate.

Potenziale tumorigenico delle cellule tumorali esprimenti il marcatore di superficie CD133

Per verificare il potenziale tumorigenico delle cellule tumorali esprimenti il CD133, abbiamo comparato l'abilità delle cellule tumorali CD133+ e CD133- isolate da campioni di tumori umani del colon e del polmone a generare tumori in seguito al trapianto sottocute di un numero variabile di tali cellule in topi immunocompromessi. I tessuti sono stati sottoposti a dissociazione meccanica e/o enzimatica e le singole cellule sono state separate sulla base dell'espressione del CD133 tramite citofluorimetria o separazione immuno-magnetica. In seguito al "sorting", la purezza delle cellule CD133+ è stata analizzata per verificare l'assenza di cellule contaminanti del sistema ematopoietico o cellule progenitrici endoteliali e per verificare la co-espressione del marcatore epiteliale Ep-CAM. L'inoculo di appena 3×10^3 cellule tumorali di colon esprimenti CD133 è stato sufficiente a generare tumori in topi SCID (severe combined immunodeficiency).

Analogamente, il trapianto sottocute di 1×10^4 cellule CD133+ isolate da diversi sottotipi di carcinoma al polmone si è dimostrato in grado di generare “xenograft” negli stessi animali. In entrambi i casi, il trapianto di un numero 10 volte maggiore di cellule CD133- non è stato capace di generare tumori. I risultati di questi esperimenti sono riassunti in Figura 1 per il tumore al colon e in Figura 2 per il carcinoma al polmone.

Come detto, l’analisi dei tumori generati nei modelli murini mediante inoculo di CST ha dimostrato che gli xenotrapianti ottenuti riproducono le caratteristiche istologiche e fenotipiche dei rispettivi tumori umani di origine. Questi risultati dimostrano quindi che sia nel tumore al colon che nel carcinoma al polmone, il potenziale tumorigenico è confinato alla sottopopolazione cellulare esprimente il CD133. È importante sottolineare che il potenziale tumorigenico delle frazioni cellulari CD133+ viene mantenuto anche a seguito a trapianti seriali di tali cellule nei modelli murini sopra descritti. In questi esperimenti, i tumori di “seconda generazione” generati hanno mantenuto la somiglianza fenotipica dei tumori umani di origine mentre l’aggressività delle CST aumenta con il numero dei passaggi *in vivo*.

Sulla base di questi risultati possiamo affermare che nel tumore al colon e nel car-

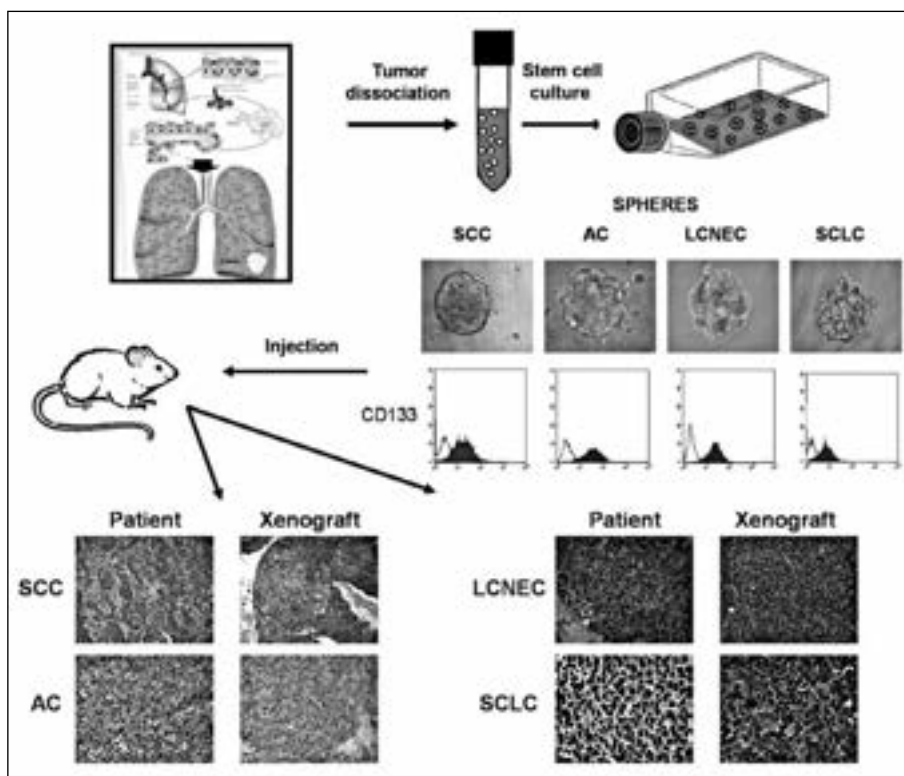


Fig. 1

cinoma al polmone il potenziale tumorigenico è confinato alle cellule CD133+, le uniche in grado di determinare l'inizio e lo sviluppo del tumore nei topi immunocompromessi inoculati. Tali cellule presentano caratteristiche di staminalità, in quanto sono in grado di autorinnovarsi e allo stesso tempo di dare origine alle cellule differenziate che costituiscono la massa tumorale.

Isolamento ed espansione in cultura delle cellule tumorali staminali

Abbiamo messo a punto delle condizioni di coltura per espandere la popolazione cellulare tumorigenica CD133+ isolata da tumori al colon e al polmone. Le cellule ottenute in seguito alla dissociazione meccanica dei tumori umani, sono state messe in coltura in presenza di un terreno privo di siero e contenente i fattori di crescita EGF (epidermal growth factor) e b-FGF (basic-fibroblast growth factor).

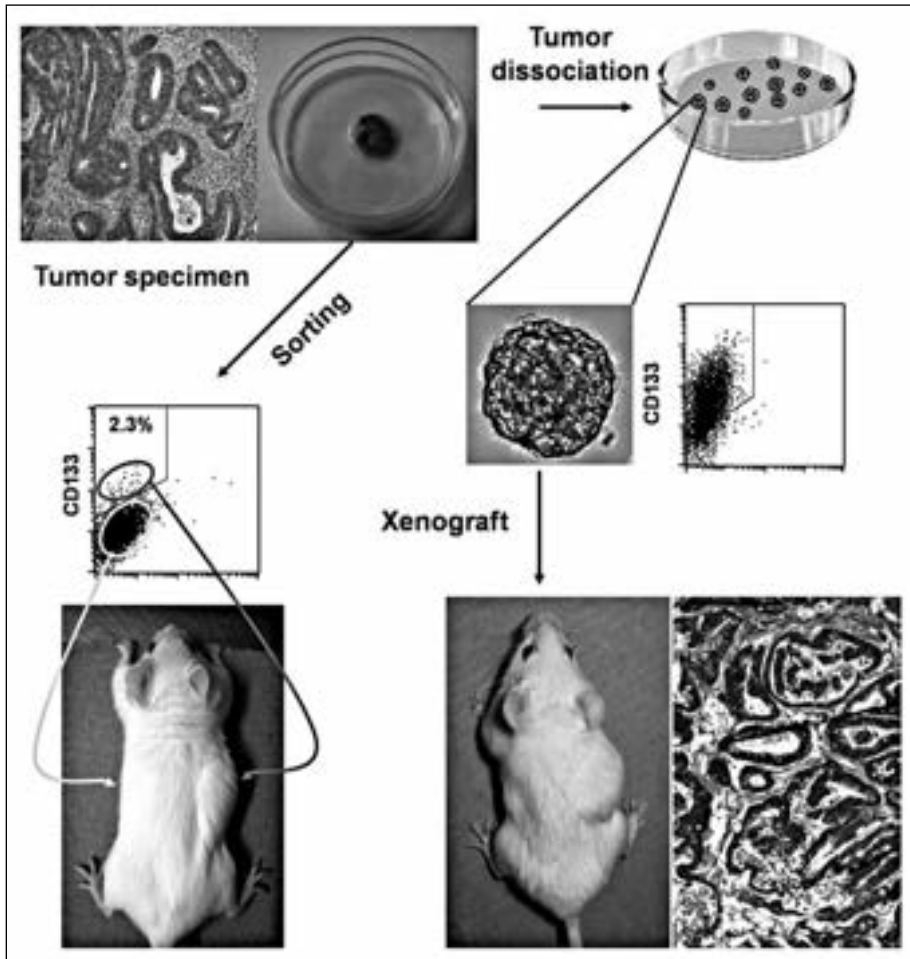


Fig. 2

In queste condizioni, le cellule crescono in modo esponenziale dando origine ad aggregati cellulari sferoidali, indicati come “sfere”, anch’esse esprimenti alti livelli del marcatore CD133. Queste sfere sono state trapiantate sottocute nei modelli murini SCID dando origine a tumori fenotipicamente simili al tumore umano di origine. Aggiungendo il siero al terreno di cultura e privandolo dei fattori di crescita, abbiamo indotto la differenziazione delle sfere tumorali in cellule aderenti esprimenti marcatori di differenziazione quali citocheratina 20 (CK20) e il CDX2 nel caso del tumore del colon e citocheratine (CKs) o N-CAM per il tumore del polmone. Contemporaneamente, l’espressione del CD133 viene regolata negativamente. Di rilievo è l’osservazione che le tali cellule tumorali differenziate non sono in grado di generare il tumore in topi immunocompromessi.

Implicazioni terapeutiche delle cellule staminali tumorali

Il modello delle CST ha importanti implicazioni per la terapia del cancro. I trattamenti antitumorali convenzionali colpiscono prevalentemente le cellule rapidamente proliferanti, che rappresentano la maggior parte della popolazione di cellule tumorali, ma potrebbero preservare la popolazione staminale. Ciò può comportare una notevole riduzione della massa tumorale, ma spesso una remissione clinica solo temporanea. Il fallimento della terapia può essere pertanto dovuto alla mancata eliminazione della componente staminale del tumore che potrebbe comportare una ricaduta e, cosa ancora più grave, la selezione di cellule tumorali resistenti e più aggressive (Fig. 3). Diverse caratteristiche delle CST contribuiscono

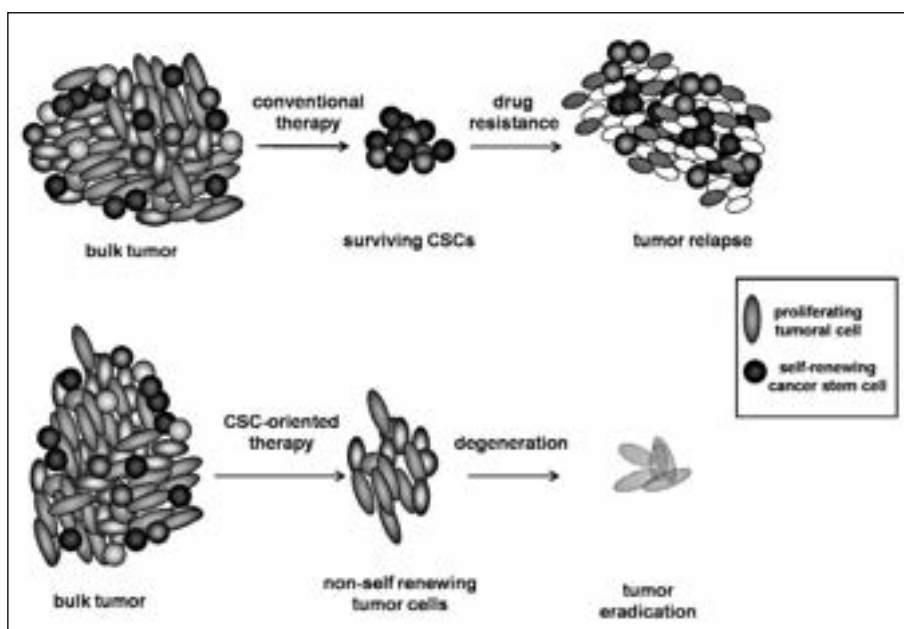


Fig. 3

a renderle estremamente resistenti e difficili da eliminare. In primo luogo, le CST sono relativamente quiescenti e questo permette loro di sfuggire da molti tradizionali protocolli terapeutici efficaci su cellule attivamente proliferanti. In secondo luogo, come mostrato per la controparte normale, le CST esprimono elevati livelli di pompe di membrana capaci di espellere attivamente i chemioterapici fuori dalla cellula, conferendo a quest'ultima una intrinseca resistenza. In terzo luogo, le vie di segnalazione che regolano l'autorinnovamento della popolazione di cellule staminali normali, come Wnt, Hedgehog e Notch, sono alterate nel tumore e contribuiscono al suo sviluppo. Pertanto, la messa a punto di un efficace approccio terapeutico richiede l'identificazione di meccanismi molecolari selettivamente attivi nelle CST e l'individuazione di agenti in grado di bloccarne la proliferazione o di indurne il differenziamento, evento che ne aumenterebbe la sensibilità ai chemioterapici.

Le CST rappresentano un promettente strumento per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici antitumorali, anche in vista di un approccio di medicina personalizzata. Sulla base dell'evidenza che l'ampia gamma di alterazioni genetiche riscontrabili nelle cellule tumorali colpisce funzionalmente un numero limitato di vie di trasduzione del segnale, un approccio di proteomica diretto ad individuare tali aberrazioni nel network di segnale intracellulare rappresenta la scelta di elezione per la scoperta di nuovi target molecolari antineoplastici. In particolare, la tecnologia nota come "Reverse phase protein microarray" (RPPM), unita alla microdissezione a cattura laser, è recentemente emersa come un ottimo strumento in grado di definire la rete di interazioni proteiche che sostengono la trasformazione maligna di cellule tumorali isolate da biopsie di tumore (7). Ciò che è più interessante rispetto alla RPPM è la possibilità che offre di identificare in modo paziente-specifico e in modalità high throughput il pattern di attivazione delle "signaling pathways" intracellulari.

Studi di fattibilità condotti dal nostro laboratorio utilizzando la tecnologia RPPM su campioni microdissezionati di cancro del colon retto metastatico hanno confermato la praticabilità di questo approccio, fornendo una base per la visione di una terapia su misura basata sull'analisi della rete di trasduzione del segnale nel tumore del singolo paziente. Inoltre, i modelli tumorali di xenotrapianto ottenuti mediante inoculo delle CST sono stati validati mediante la stessa tecnologia come modelli in grado di riprodurre fedelmente il tumore del paziente a livello di trasduzione del segnale. Più in dettaglio, un'analisi comparativa mediante RPPM dei tumori del paziente e degli xenotrapianti generati dalle CST o da linee cellulari tumorali convenzionali ha rivelato che la somiglianza nello stato di attivazione del network di segnalazione tra i tumori originali e gli xenotrapianti derivati dalle CST è significativamente superiore rispetto a quella tra i tumori dei pazienti e gli xenotrapianti ottenuti dalle linee cellulari commerciali.

Di rilievo è l'osservazione che il medesimo profilo fosfoproteomico è mantenuto anche negli xenotrapianti generati da CST dopo oltre un anno di coltura in vitro, dato che conferma la stabilità del sistema delle CST. Questa evidenza sperimentale dimostra l'enorme valore dei modelli basati sulle CST per la sperimentazione preclinica di terapie a bersaglio molecolare, rivelando allo stesso tempo la

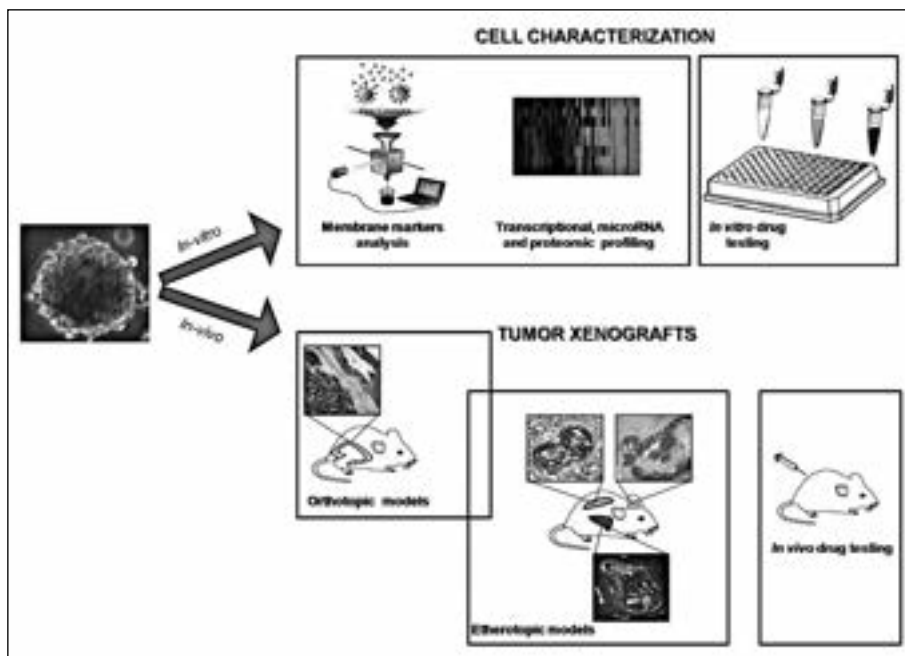


Fig. 4

scarsa affidabilità delle linee cellulari standard quali modelli preclinici tumorali. Infine, alcuni dati preliminari hanno confermato che l'efficacia di un dato farmaco (ad esempio, l'inibitore di una chinasi specifica) dipende dal livello di attivazione del suo target. Coerentemente, screening di farmaci eseguiti in vitro su CST hanno chiaramente dimostrato la corrispondenza tra gli effetti citotossici di alcuni inibitori di chinasi e lo stato di attivazione delle stesse chinasi, come ha rivelato l'analisi di RPPM.

Questi risultati sostengono con forza il razionale di una strategia terapeutica secondo la quale un profilo molecolare che dimostra l'attivazione di determinate vie di segnalazione nelle cellule tumorali (o più precisamente in CST) può essere associato a specifici bersagli farmacologici e dunque a determinati farmaci a bersaglio molecolare. In conclusione, un approccio sistematico per individuare e neutralizzare i meccanismi molecolari che sostengono la sopravvivenza delle CST sembra essere l'unica via percorribile al fine di sviluppare nuovi e più efficienti terapie antineoplastiche.

L'analisi genomica applicata allo studio dei tumori ha rivelato l'esistenza di una grande variabilità genetica tra i singoli tumori il che rende estremamente complesso l'uso esclusivo di questo approccio alla biologia del cancro. Allo stesso tempo, è sempre più chiaro che i tumori presentano caratteristiche comuni a livello di network proteici, suggerendo che una prospettiva orientata all'analisi di queste vie di segnalazione rappresenterebbe l'approccio più efficace per la scoperta di nuovi farmaci e nuove terapia (Fig. 4).

Bibliografia essenziale

1. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; 3: 730-737.
2. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63 (18): 5821-5828.
3. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004; 64 (19): 7011-7021.
4. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100 (7): 3983-3988.
5. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K, Coghlan L, Tang DG. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene.* 2006; 25: 1696-1708.
6. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007; 445 (7123): 111-115.
7. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007; 445 (7123): 106-110.
8. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008; 15 (3): 504-514.
9. Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, Barrett JC, Liotta LA. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1 (9): 683-695.

Il modello Zebrafish per l'ematopoiesi normale e leucemica

Michele Malagola, Elisa Alghisi, Cesare Bergonzi, Carla Fili, Annalisa Peli, Cristina Skert, Alessandro Turra, Federica Cattina, Elisabetta Faucher, Paola Malamani, Domenico Russo

Cattedra di Ematologia, Università degli Studi di Brescia, Unità di Trapianto di Midollo Osseo per Adulti, AO Spedali Civili di Brescia

Da oltre 50 anni, l'utilizzo di *Zebrafish* (*Danio Rerio* - ZF) come modello animale ha permesso di ottenere informazioni fondamentali nella ricerca in embriologia. Le prime osservazioni riguardanti l'emopoiesi risalgono agli anni '60 quando, ZF venne descritto come un pesce teleosteo con origine intraembrionica del compartimento emopoietico (1). Nell'ultima decade l'utilizzo di nuovi approcci tecnici in genetica ha permesso di selezionare diversi mutanti di ZF caratterizzati da difetti nell'emopoiesi che inducono un fenotipo patologico simile a tipiche malattie ematologiche umane. A livello genetico infatti, diversi importanti fattori di trascrizione e i rispettivi meccanismi d'azione sono altamente conservati durante l'evoluzione. Allo stesso modo, anche dal punto di vista cellulare, ZF possiede cellule del sangue morfologicamente paragonabili a quelle umane (2). In aggiunta ai vantaggi che derivano dalla biologia semplice e dalla genetica particolarmente accessibile, il modello ZF combina molte delle caratteristiche di altri modelli animali come il rapido sviluppo proprio della *Drosophila* o la fecondazione esterna e la trasparenza degli embrioni tipica di *Xenopus*. Combinando le caratteristiche biologiche con i vantaggi derivanti dalla conservazione genetica risulta evidente come ZF sia diventato in poco tempo uno dei modelli animali più utilizzati per lo studio dell'emopoiesi normale e patologica.

L'emopoiesi in Zebrafish e nei mammiferi

Tutti i vertebrati, pesci inclusi, possiedono due stadi di emopoiesi: uno *stadio primitivo* e uno *definitivo*. Come nei vertebrati complessi anche in ZF le cellule del sangue derivano da *Cellule Staminali Emopoietiche* (Hemopoietic Stem Cells) multi potenti, prodotte solo durante lo stadio definitivo. Nei mammiferi il sito preferenziale di emopoiesi primitiva si ritrova nel Sacco Vitellino, extra-embriónico. In ZF l'emopoiesi primitiva, invece, ha luogo in due regioni intra-embriónicas al di sopra del Sacco Vitellino: il mesoderma anteriore laterale (Anterior Lateral

Mesoderm - ALM) e il mesoderma laterale posteriore (Posterior Lateral Mesoderm - PLM) che diventa in seguito Inner Cell Mass (ICM). I progenitori cellulari in queste due regioni sono geneticamente indipendenti. L'emopoiesi primitiva dura meno di 24 ore e dà origine prevalentemente a macrofagi primitivi nel mesoderma anteriore (*mielopoiesi*) e a pro-eritrociti a livello del mesoderma posteriore laterale (*eritropoiesi*). I primi progenitori cellulari ematopoietici multipotenti si ritrovano invece in una zona dell'embrione definita Posterior Blood Island (PBI): queste cellule daranno origine sia alla linea mieloide che alla linea eritroide durante lo stadio transiente tra l'ematopoiesi primaria e quella definitiva.

L'emopoiesi definitiva in ZF, invece, si osserva a livello di una zona definita, come nei mammiferi, Aorta-Gonadi-Mesonefroni (Aorta Gonads Mesonephros - AGM). L'endotelio dell'AGM è definito emogenico e può differenziare sia in cellule endoteliali, che in progenitori ematopoietici i quali migreranno e colonizzeranno altri siti di emopoiesi definitiva come il tessuto caudale ematopoietico (Caudal Hematopoietic Tissue) e il midollo renale, l'equivalente del midollo osseo ematopoietico dei mammiferi.

Il midollo renale contiene tutte le diverse linee cellulari ematopoietiche inclusa la linfocitopoiesi B. I progenitori linfoidi dei linfociti T invece maturano nel timo. La circolazione delle prime cellule del sangue, i pro-eritrociti, si osserva già 24 ore dopo la fecondazione, mentre i progenitori ematopoietici entrano in circolo 33 ore dopo la fecondazione e a 48 ore colonizzano il rene. A partire da due giorni dopo la fecondazione, e durante l'intera vita di ZF, il midollo renale rappresenta l'unico sito di emopoiesi definitiva e l'unico organo in cui si ritrovano le Cellule Staminali Ematopoietiche (3).

La maggior parte delle conoscenze riguardo l'emopoiesi in ZF deriva dall'isolamento e dalla caratterizzazione di fattori di trascrizione omologhi a quelli umani. Già 10 ore dopo la fecondazione questi fattori di trascrizione vengono espressi in un determinato profilo spazio-temporale che garantisce la specificazione delle cellule staminali ematopoietiche definitive. L'emopoiesi definitiva, ad esempio, è iniziata dalle cascate trasduzionali di geni noti anche in altri vertebrati come *Hedgehog*, *VEGF* e *NOTCHRUNX*, *BMP* e *PGE2-WNT* ovvero geni fondamentali per la formazione delle cellule staminali ematopoietiche multipotenti (4).

Forward genetic, reverse genetic, modelli transgenici

Le proprietà molecolari di molti fattori di trascrizione e diversi pathways molecolari presenti nelle cellule staminali ematopoietiche sono stati meglio caratterizzati grazie alla ricerca in ZF. Il modello ZF rappresenta infatti il modello animale ideale per gli screening su larga scala di *Forward genetic*, che hanno consentito l'identificazione dei geni responsabili di alcune patologie ematologiche umane. Sono stati infatti descritti più di 40 mutanti con difetti nell'ematopoiesi suddivisi in 26 gruppi con caratteristiche condivise. I fenotipi clinici possono essere classificati in più categorie: i mutanti senza globuli rossi, quelli con anemia progressiva, altri con anemia ipocromica e i mutanti fotosensibili (5). Gli screening di mutagenesi su larga scala con *Etil-Nitroso-Urea* hanno generato

mutanti con interessanti fenotipi clinici ma hanno anche evidenziato come la conservazione genica caratterizzi anche i geni coinvolti nella leucemogenesi.

Mentre gli screening di Forward genetic (*dal fenotipo al gene*) consentono di identificare in vivo nuovi geni coinvolti in maniera indiscriminata, le tecniche di Reverse genetic (*dal gene al fenotipo*) permettono di silenziare o modificare l'espressione di specifici geni bersaglio in modo da creare modelli animali transgenici per lo studio delle leucemie. Uno degli aspetti tecnici più problematici negli screening di Reverse genetic è rappresentato dall'incapacità di direzionare le mutazioni in un specifico gene d'interesse all'interno del genoma. L'inattivazione specifica di un gene, in ZF, ha sempre richiesto processi impegnativi e dispendiosi come l'impiego di mutagenesi random per indurre mutazioni puntiformi o l'uso di vettori retrovirali che si inseriscono casualmente all'interno delle sequenze geniche. I processi di mutagenesi random sono spesso seguiti da diverse tecniche di PCR, che permettono la visualizzazione dell'effettiva mutazione nel gene d'interesse (6).

Recentemente diversi gruppi di ricerca hanno presentato una strategia che permette di inattivare un gene specifico di cui sia nota la sequenza. Questa tecnica si avvale dell'utilizzo di endonucleasi - *Zinc finger endonuclease* - che tagliano il doppio filamento nucleotidico bersaglio grazie al riconoscimento di sequenze specifiche che possono essere "disegnate" in vitro (7). Sia le strategie *in silico* che le metodiche *in vitro* per identificare le sequenze target si stanno ampiamente diffondendo nella comunità scientifica rendendo così possibile l'utilizzo di modelli *knock out* anche in ZF.

Le notevoli potenzialità di ZF permettono di creare modelli transgenici che esprimano proteine esogene in un determinato organo o tessuto, attraverso l'uso di promotori tessuto-specifici. Inoltre geni esogeni possono essere manipolati per essere co-espressi con proteine fluorescenti in modo da selezionare i mutanti transgenici o monitorare un'eventuale progressione tumorale (8, 9).

Modelli Transgenici di Leucemia Queste strategie sono state sfruttate per la prima volta nel 2003 quando il potente oncogene murino *c-myc* venne espresso in ZF sotto il controllo del promotore tissutale *rag2*, tipico promotore d'espressione dei linfociti T (10). Il modello transgenico *Tg:rag2-EGFP-cMyc* mostra il rapido sviluppo di una leucemia linfoblastica acuta che deriva dal timo: i linfociti T si diffondono localmente alle branchie e nel tessuto retro orbitale, disseminano il muscolo scheletrico e infiltrano gli organi addominali, portando ad una morte precoce. Le cellule leucemiche si stabilizzano nel timo anche se trapiantate attraverso la cavità peritoneale in pesci wild type irradiati. La presenza della proteina fluorescente permette la visualizzazione dell'esordio e della diffusione della leucemia. Sfortunatamente la leucemia derivante da questa linea transgenica è caratterizzata da una elevata penetranza che rende porta inevitabilmente a morte l'animale dopo circa 3 mesi di vita ed impedisce dunque la creazione di una linea stabile. Per ovviare al problema della letalità del transgene è stato messo a punto un sistema *Cre/lox* nel quale il costrutto *rag2-EGFP-cMyc* è preceduto da una proteina fluorescente *dsRED2* con codon stop fiancheggiati da siti loxP. Il sistema *Cre/lox* già utilizzato in *Xenopus* e nel topo, si avvale dell'utilizzo di una ricom-

binasi virale *Cre* che riconosce siti specifici definiti *loxP* e induce la ricombinazione delle sequenze fiancheggiate da questi siti. Dunque l'iniezione del costrutto *rag2-loxP-dsRED2-loxP-EGFP-cMyc* risulta nell'espressione della proteina fluorescente dsRED2 ma non nell'espressione dell'oncogene cMyc. Al contrario, iniettando contemporaneamente sempre a livello embrionale, RNA messaggero della ricombinasi si determina l'escissione della sequenza *loxP-dsRED2-loxP* con conseguente giustapposizione del promotore *rag2* all'oncogene cMyc (11). Sfortunatamente in questi embrioni si osserva una bassa penetranza (13%) della patologia dovuta a ricombinazioni imperfette e che limitano le potenzialità sperimentali di questo modello. Quindi per regolare l'espressione della ricombinasi nel 2007 è stato sviluppato un nuovo sistema nel quale zebrafish doppio-transgenici esprimano sia la sequenza *rag2-loxP-dsRED2-loxP-EGFP-cMyc* che la ricombinasi *Cre* posta sotto il controllo di un promotore calore-inducibile: *hsp70*. Attraverso il trattamento di *heat-shock* (45 min a 37°C) si può osservare a 120 giorni dopo fecondazione un'elevata penetranza di induzione al tumore (80%), che rende questo modello un sistema ideale per lo studio della tumorigenesi della linea linfoide (12).

Lo sviluppo di modelli di leucemia mieloide in ZF appare invece rallentato rispetto ai modelli di leucemia linfoide. Questo potrebbe essere in parte dovuto alla difficoltà di trovare promotori specifici per l'espressione nel compartimento mieloido. L'esperienza nei modelli murini ha inoltre insegnato l'importanza di esprimere questi geni in condizioni spazio temporali ben definite ed è probabile che le stesse restrizioni debbano essere applicate anche in ZF.

Runx1 conosciuto anche come *AML1* è stato isolato inizialmente nella traslocazione (8; 21) (q22; q22). Questa traslocazione si ritrova approssimativamente nel 40% di individui con il sottotipo M2 di Leucemia Mieloide Acuta e risulta nella formazione di una proteina chimerica conosciuta come *RUNX1-CBF2T1* o *AML1-ETO*. Questa proteina di fusione interagisce con recettori nucleari e recluta fattori di trascrizione normalmente non presenti. Il risultato è rappresentato dalla proliferazione della linea mieloide e down regolazione del differenziamento dei granulociti. Per valutare la validità di ZF come modello per la leucemia del compartimento mieloide gli embrioni sono stati iniettati con il costrutto *hsp70-RUNX1-CBF2T1* e la presenza della proteina di fusione è stata verificata con semplici analisi di Western Blot (13). Anomalie nello sviluppo delle cellule del sangue e nella circolazione con emorragie nel rene si possono osservare già a partire da 48 ore dopo fecondazione. L'espressione dei marcatori endoteliali è perturbata, indicando aberrazioni nello sviluppo dell'albero circolatorio. Una notevole riduzione nell'espressione di fattori di trascrizione tipici del differenziamento sono indicativi invece di un'alterata emopoiesi definitiva. L'analisi citologica del sangue degli embrioni iniettati mostra cellule immature con morfologia blastica e nucleo atipico riconducibile alla linea mieloide. La linea eritroide presenta caratteristiche displasiche con nuclei irregolari e maturazione ritardata. L'espressione della proteina di fusione *RUNX1-CBF2T1* determina un fenotipo caratterizzato da numerose analogie con il modello murino. Questi risultati combinati con i vantaggi che questo modello animale possiede rendono ZF un model-

lo valido e flessibile per la valutazione della leucemogenesi mediata dalla traslocazione t(8;22). Nel 2009 il modello di leucemia mieloide acuta è stato utilizzato per lo screening di sostanze chimiche in grado di modificare le alterazioni ematopoietiche dovute all'espressione del gene di fusione. Questo approccio potrebbe aprire le porte allo sviluppo di nuovi target terapeutici responsabili dell'insorgenza della leucemia e sottolinea nuovamente le potenzialità di ZF come modello animale per lo studio dell'emopoiesi patologica (14).

Nel 2005 in Australia, alcuni Ricercatori hanno cercato di creare un modello di studio di leucemogenesi dipendente dalla presenza della proteina di fusione TEL-JAK215. Questa proteina codifica per una chinasi costitutivamente attiva ed è stata identificata in alcuni pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta e leucemia mieloide cronica atipica. La proteina di fusione Tel-jak2 determina la crescita delle cellule del compartimento emopoietico, indipendentemente dalla presenza di fattori di crescita ed è responsabile dell'induzione di malignità in vitro e in modelli murini. In questo modello animale gli embrioni sono stati iniettati con il costrutto di fusione *tel-jak2* usando sequenze di ZF ortologhe a quelle umane. In modo da visualizzare l'effettiva espressione della proteina negli embrioni trasparenti il costrutto è stato coniugato ad una sequenza Flag. L'intero costrutto *Flag-tel-jak2* è stato dunque inserito in un vettore specifico sotto il controllo di elementi regolativi del promotore della linea mieloide *spi1* in modo da simulare il profilo

d'espressione spazio-temporale osservato nelle leucemie mieloidi. L'analisi istologica degli embrioni a 48 ore mostra l'accumulo di leucociti più grandi rispetto al controllo. Analisi di ibridazione in situ dimostrano che queste cellule sono negative per i markers della linea eritroide e linfoide, sottolineando ulteriormente l'espansione del compartimento mieloide. Sfortunatamente il costrutto determina un elevato tasso di mortalità e non è stato ancora possibile creare una linea transgenica stabile ma i risultati raccolti finora dimostrano come Zebrafish possa diventare un ottimo modello animale anche per la leucemogenesi della linea mieloide.

Acknowledgments

PRIN (protocol number: RBAU01RLNB005 – 2004; D. Russo), progetto 60% 2009 (D. Russo) e Piano Regionale Sangue – Regione Lombardia.

Bibliografia

1. Colle-Vandeveld A. Blood anlage in Teleosti. Nature 1963; 198: 1223.
2. Johnson RA, Hart NH, Powell D. Studies on the morphology of blood cells in the fresh water teleost, *Brachydanio rerio*. Bull N Y Acad Science. 1973; 18: 20-21.
3. Davidson AJ, Zon LI. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish haematopoiesis. Oncogene. 2004; 23: 7233-7246.
4. Hsia N, Zon LI. Transcriptional regulation of hematopoietic stem cell development in zebrafish. Experimental Hematology. 2005; 33: 1007-1014.

5. Weistain BM, et al. Hematopoietic mutations in the zebrafish. *Development*. 1996; 123: 303-309.
6. Skromne I, Prince EP. Current perspectives in Zebrafish reverse genetics: moving forward. *Developmental Dynamics*. 2008; 237: 861-882.
7. Amacher S. Emerging gene knock out technology in zebrafish: zinc-finger nucleases. *Briefings in functional genomics and proteomics*. 2008; 7: 460-464.
8. Uvadia AJ, Linney E. Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Developmental Biology*. 2003; 256: 1-17.
9. Payne E, Look T. Zebrafish modelling of leukemias. *British Journal of Hematology*. 2009; 146: 247-256.
10. Langenau DM, et al. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science* 2003; 299: 887-890.
11. Langenau DM, et al. Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia. *PNAS* 2005; 102: 17: 6068-6073.
12. Feng H, et al. Heat-shock induction of T-cell lymphoma/leukemia in conditional Cre/lox-regulated transgenic zebrafish” *British Journal of Hematology* 2007; 138: 169-175.
13. Yeh JR J, et al. AML1-ETO reprograms hematopoietic cell fate by downregulation scl expression. *Development*. 2008; 135: 401-410.
14. Yeh JR J, et al. Discovering chemical modifiers of oncogene-regulated hematopoietic differentiation. *Nat Chem Biol*. 2009; 5 (4): 236-243.
15. Onnebo SMN, et al. Hematopoietic perturbation in zebrafish expressing a tel-jak2 fusion.

Il ruolo della bioinformatica. Metodi e strumenti computazionali per l'integrazione di dati e conoscenza: il progetto i2b2

Riccardo Bellazzi^{1,2}, Daniele Segagni², Alberto Zambelli²

¹Dipartimento di Informatica e Sistemistica, Università di Pavia

²IRCCS Fondazione S. Maugeri, Pavia

I nostri tempi sono stati testimoni di una vera rivoluzione in campo biomedico: gli eccezionali miglioramenti tecnologici nella capacità di effettuare misure ad alta densità a livello molecolare hanno portato ad una crescita esplosiva della quantità di dati disponibili di natura genomica, trascrittomica, proteomica e metabolomica (Louie et al., 2007). Questo ha comportato la possibilità di compiere “un balzo in avanti” nella comprensione dei meccanismi molecolari alla base delle malattie umane, grazie alla capacità di valutare profili molecolari individualizzati. È oggi possibile avere a disposizione nuovi biomarcatori per la predizione del comportamento delle malattie, nuove tecnologie per la diagnosi e lo staging delle patologie, e nuove terapie per il targeting cellulare e molecolare. Tuttavia, questa rivoluzione non sarebbe stata possibile senza il supporto delle tecnologie informatiche e senza la disponibilità di dati e conoscenza che Internet ed il Web hanno reso accessibili a tutti i ricercatori biomedici (Ciccarese et al., 2008, Roos et al., 2009). In particolare, i ricercatori in ambito oncologico sono stati fra i primi ad utilizzare intensivamente le tecnologie ed i dati “-omici” (Nagl, 2006) e ad organizzare delle “community” in grado di mettere a fattor comune tutti gli sforzi effettuati dagli svariati laboratori che affrontano il tema della ricerca sul cancro nel mondo.

È infatti apparso presto chiaro che la ricerca oncologica dipenderà sempre più dall'analisi delle informazioni disponibili e, quindi, dalla consapevolezza che la bioinformatica sarà nei prossimi anni il più importante strumento di supporto all'analisi disponibile per i ricercatori.

Già ora, la genomica e la proteomica dipendono fortemente dall'analisi automatica delle informazioni per svolgere le ormai classiche elaborazioni di analisi di sequenza, predizione di domini genomici attivi, di struttura, analisi funzionale dell'espressione genica, ecc. In prospettiva, altri ambiti di ricerca, quali l'analisi della variabilità genetica e delle mutazioni e l'analisi del metaboloma, produrranno grandi quantità di dati che potranno essere analizzati esclusivamente in-silico e che necessiteranno di sempre maggiori strumenti computazionali e di analisi statistica. In tale contesto, la pianificazione di studi e l'analisi statistica di dati integrati di

tipo clinico e “omico”, per la valutazione del contributo diagnostico e prognostico di tecnologie molecolari avanzate, si giova della cooperazione fra ricercatori informatici, statistici biomedici e ricercatori clinici. Un esempio di grande interesse è fornito dal “Cancer Bioinformatics Grid (caBIG) program” del National Cancer Institute Americano (<https://cabig.nci.nih.gov/>), creato per facilitare la condivisione di infrastrutture IT, dati e applicazioni software fra gli istituti sponsorizzati dalla NIH per la ricerca sul cancro (McConnell et al., 2008, Cimino et al., 2009). Questa iniziativa è stata lanciata nel 2004 ed attualmente conta oltre 190 istituti di ricerca affiliati e oltre 1000 ricercatori aderenti; sono stati sviluppati oltre 40 applicativi software per l’analisi dei dati, la gestione di clinical trials e la gestione dei laboratori. Di grande interesse è poi il lavoro effettuato per dotare la comunità di un “vocabolario” e di un’ontologia comune, in modo da permettere la condivisione di dati e conoscenza fra i diversi centri di ricerca (Shah, 2009).

Oltre a Cabig, vi sono una svariata serie di risorse online disponibili, come il Cancer Gene anatomy project (<http://cgap.nci.nih.gov/>) o il progetto Oncomine (<https://www.oncomine.org/>) che permettono ai ricercatori di avere a disposizione in modo integrato tools di analisi, dati, annotazioni ed infine l’accesso veloce a risorse bibliografiche mediante algoritmi di analisi automatica dei testi (text mining) (Roberts et al., 2008).

Se le risorse computazionali a disposizione sono rilevanti, un ambito che deve trovare ancora delle soluzioni e delle risposte è quello del collegamento fra la ricerca e la pratica clinica e della messa a punto di infrastrutture software adeguate per raggiungere questo scopo.

La “Medicina Translazionale”, intesa come il processo di trasformazione dei risultati della ricerca nella pratica clinica, necessita di due passi fondamentali: i) l’applicazione dei risultati al contesto medico/clinico; ii) l’effettivo miglioramento della salute della popolazione.

Lo sviluppo di nuovi sistemi informativi a supporto di questo processo, che potremmo definire come “Bioinformatica Translazionale”, richiede uno sforzo di grande portata per evitare di passare da fattore “abilitante” a fattore “limitante” la ricerca biomedica (Butte, 2008, Butte, 2009).

Lo sforzo necessita di due direzioni fondamentali: (1) la trasformazione delle soluzioni informatiche all’interno degli ospedali, cartelle cliniche elettroniche, sistemi di gestione elettronica degli ordini farmaceutici, sistemi di supporto alle decisioni, in sistemi per il supporto congiunto alla clinica ed alla ricerca, ovvero in sistemi di supporto alla ricerca translazionale (Nuzzo, Riva and Bellazzi, 2009) (1, 2) l’espansione e la revisione del ruolo e dello scopo della bioinformatica, al fine di consentire un effettivo utilizzo delle soluzioni computazionali e delle grandi moli di dati gestiti dai data-base biologici in un ambito medico-clinico (Nuzzo and Riva, 2008).

In Italia un’esperienza simile è stata progettata nell’ambito della rete degli IRCCS a vocazione oncologica denominata Alleanza Contro il Cancro (ACC, www.alleanzacontroilcancro.it). In tale contesto è stato suggerito uno studio di fattibilità con l’obiettivo di creare una Rete Nazionale di Bioinformatica Oncologica (RNBO, <http://acc.cineca.it/ACC/>) in grado di coordinare le attività

bioinformatiche degli Istituti partecipanti ad Alleanza contro il Cancro al fine di integrare ed elevare le attuali competenze e poter quindi ottimizzare e innovare le attività di ricerca e cliniche in oncologia basate sull'analisi in-silico e sull'automazione delle procedure e dei processi (Romano et al., 2008).

Tuttavia la possibilità di integrare la ricerca di base e di laboratorio di tipo "omico" con la ricerca clinica applicata rimane un obiettivo non ancora facilmente ottenibile per ragioni in parte di costo della ricerca e in parte perché gli stessi strumenti informativi e computazionali segnano la necessità di innovazione.

Una direzione di grande interesse e di immediata applicabilità riguarda la creazione di un'infrastruttura informatica per la messa a disposizione dei ricercatori dei dati raccolti durante la pratica clinica ed ai clinici dei risultati disponibili dai più recenti studi in campo oncologico.

I margini per un contemporaneo miglioramento della qualità dei trattamenti e la conduzione più efficiente di studi clinici hanno motivato diversi ricercatori nella realizzazione di questi tipi di architetture computazionali. È noto infatti che il costo di studi clinici che includano grandi popolazioni di pazienti e richiedano delle misure - omiche high throughput possa richiedere oltre 1000\$ a persona, tenendo ovviamente conto anche dei costi di reclutamento. D'altra parte, almeno negli Stati Uniti, l'investimento complessivo per l'informatizzazione degli ospedali è almeno di 7 miliardi di dollari l'anno (Murphy et al., 2009). Sebbene vi sia ancora un certo scetticismo sulla possibilità di utilizzare i dati raccolti durante la clinica nella ricerca, il Partners Center di Boston e l'Università di Harvard hanno attivato un centro di ricerca denominato i2b2 (Informatics for Integrating Biology and the Bedside, <http://www.i2b2.org>), finanziato dal National Institute of Health (NIH). Il progetto si propone di realizzare un'infrastruttura informatica per la ricerca biomedica che integri ed utilizzi tutti i dati provenienti dalla pratica clinica e dai ricoveri ospedalieri, mettendoli a disposizione in forma anonima e facilmente accessibile ai ricercatori degli ospedali consorziati nel Partners center (Murphy et al., 2007).

Il progetto i2b2 e i2b2-Pavia

Il progetto i2b2 ha iniziato le sue attività integrando i dati di 2.5 milioni di pazienti, le cui informazioni cliniche erano disponibili presso l'Harvard Medical School. Nei primi tre anni di attività ha sviluppato del software open-source strutturato in un'architettura "ad alveare" detta Hive.

Il software è stato sviluppato in Java e utilizza la tecnologia dei Web-Services all'interno di una struttura client-server. Per consentire non solo la selezione informatizzata dei pazienti da arruolare per la ricerca, ma anche il reperimento ad alta efficienza di campioni biologici in particolare in applicazioni oncologiche, i2b2 è stato inoltre integrato con il progetto Crimson, sviluppato dal Dipartimento di Patologia del Brigham and Women's hospital.

Crimson è un sistema per la gestione di una biobanca di campioni biologici raccolti durante gli accessi alle strutture sanitarie e non utilizzati (Murphy et al.,

2009). L'integrazione con i2b2 permette non solo di identificare i pazienti con caratteristiche cliniche di interesse, ma anche di verificare la disponibilità di loro campioni biologici e di utilizzarli.

I ricercatori di i2b2 stimano che l'utilizzo del loro sistema e della sua integrazione con Crimson permetta di abbattere i costi delle ricerche genetico/cliniche anche di alcuni milioni di dollari per studi che coinvolgano più di mille pazienti. Anche il governo olandese ha recentemente cofinanziato un progetto con i medesimi obiettivi di i2b2.

Il progetto, ha avuto 37 milioni di euro per un valore complessivo di 67 milioni di euro e coinvolge 8 ospedali accademici nazionali.

Grazie ad un accordo fra il Dipartimento di Informatica e Sistemistica dell'Università di Pavia (UNIPV) ed il Partners Center di Boston, UNIPV è oggi un partner accademico del progetto, ed è pertanto possibile implementare presso gli ospedali pavesi la medesima architettura [Larizza et al. 2009]. La realizzazio-



Fig. 1 - La finestra principale dell'interfaccia Web di i2b2. A sinistra sono presenti i concetti, che possono essere spostati con il mouse nella finestra di destra e comporre delle interrogazioni "dinamiche" al data-warehouse. Le interrogazioni e le analisi effettuate precedentemente vengono salvate all'interno del sistema per usi futuri.

ne di questa infrastruttura informatica potrebbe poi rappresentare un esempio replicabile in ambito lombardo e nazionale, che permetta a ricerca e pratica clinica di trovare un terreno comune, portando congiuntamente benefici ai cittadini in termini di salute e risparmi importanti per il sistema ricerca del territorio.

Il progetto i2b2-Pavia in collaborazione con l'IRCCS Fondazione S. Maugeri nasce dall'esigenza di analizzare dati relativi a pazienti provenienti dal reparto di Oncologia.

Tecnologicamente il progetto i2b2 consiste in:

- un database basato su una architettura a stella;
- un'applicazione server side cui scopo è quello di esporre metodi dedicati all'estrazione e alla gestione dei dati;
- un'applicazione client-web che tramite un comune browser permette di interagire con il sistema.

La struttura del database utilizzata è definita "star schema" (Kimball e Ross, 2002). Tale struttura risulta essere lo standard nei modelli di archiviazione dati all'interno di datawarehouse.

Una struttura a "star schema" consiste fondamentalmente in una tabella centrale, denominata "fact table", in cui vengono immagazzinate le informazioni relative alle osservazioni effettuate su ogni singolo paziente. Tale "fact table" risulta legata ad un numero variabile di tabelle che vengono dette "dimension tables": ogni "dimension table" identifica un oggetto all'interno della "fact table". Nello specifico dello "star schema" del progetto i2b2 si hanno dimension tables relative a pazienti, visite e concetti. Un concetto è una riga nella "dimension table" dei

The screenshot shows the i2b2 Query & Analysis Tool interface. On the left, there is a navigation pane with a tree view under 'Demographics' showing various age ranges and gender options. The main workspace displays a table of patient data. The table has columns for Patient Num, Sex, Birth Date, and Vital Status. The data is sorted by Patient Num in ascending order. The table shows 17 rows of data, with the first row being Patient Num 0, Female, Birth Date 1970-11-23, and Vital Status N. The last row is Patient Num 2713, Male, Birth Date 1950-10-13, and Vital Status N. The interface also includes a 'Patient Set' field with the value 'ABSTRACT-Operative 04-04 (3-4-2010) (name) (P4783716)' and an 'Export Data' button.

Patient Num	Sex	Birth Date	Vital Status
0	Female	1970-11-23	N
100	Male	1962-09-20	N
194	Female	1969-05-17	N
374	Female	1964-07-30	N
575	Female	1962-04-09	N
859	Female	1965-06-30	N
742	Female	1962-06-18	N
1,182	Male	1949-08-25	N
1,191	Female	1950-12-16	N
1,843	Female	1975-04-04	N
2,423	Female	1976-03-10	N
2,487	Female	1966-09-18	N
2,583	Female	1956-11-25	N
2,689	Female	1991-07-12	N
2,898	Female	1981-10-18	N
2,898	Female	1970-12-11	N
2,713	Male	1950-10-13	N

Fig. 2 - Una volta effettuata l'interrogazione, i dati possono essere visualizzati ed esportati in forma anonima.

concetti che identifica una misura specifica per un paziente all'interno della "fact table". In parallelo allo "star schema" principale esiste, all'interno del progetto i2b2, uno schema dedicato alle Ontologie, nel quale vengono memorizzati in maniera gerarchica i dati relativi ai concetti che vogliono essere utilizzati per effettuare ricerche.

Una buona analisi di concetti biologici, medici e fenotipici da utilizzare come stratificatori per ricerche di pazienti risulta quindi essenziale per poter associare a variabili discrete o continue un valore fenotipico.

Il core del progetto i2b2 risiede nell'applicazione server side. Tale applicazione, denominata *hive* (alveare), è composta da più celle ognuna dedicata per una singola operazione.

Ogni singola cella che compone l'hive è coordinata da una cella principale, detta Project Manager Cell, il cui compito è quello di smistare le richieste provenienti dall'applicazione client, verso la cella dedicata. Questa struttura così flessibile permette una grande personalizzazione, possibile tramite lo sviluppo di nuove celle per operazioni dedicate.

Il client invece consiste in un'applicazione web utilizzabile tramite un qualsiasi browser, sviluppata utilizzando tecnologia ajax (Asynchronous Javascript and XML) e permette un'interazione dinamica e veloce dei dati. Una delle caratteristiche principali del client web è la possibilità di personalizzazione tramite lo sviluppo e l'integrazione di propri plugin.

Per il progetto i2b2-pavia riguardante i pazienti oncologici è stata sviluppata un'applicazione software dedicata all'esportazione dei dati e delle informazioni necessarie che si interfaccia direttamente con il database centrale del SIO della Fondazione S. Maugeri e, previa anonimizzazione delle informazioni, popola il database i2b2.

Oltre ai dati provenienti dal SIO della Fondazione S. Maugeri, all'interno di i2b2 saranno presenti anche le informazioni relative ai dati contenuti nel database della biobanca oncologica della Fondazione S. Maugeri, in modo tale da poter avere il maggior numero di informazioni eterogenee per ogni paziente e quindi aumentare sia il numero di variabili con cui i ricercatori potranno effettuare ricerche sia il numero di variabili di osservazione risultanti dalle ricerche stesse.

Alcune informazioni riguardanti il progetto i2b2-oncologia:

- pazienti totali registrati nell'anagrafica oncologica SIO: 9830;
- cartelle cliniche in stato aperto: 1918;
- cartelle cliniche in stato chiuso: 34691;
- n. pazienti in degenza con cartella clinica in stato aperto: 885;
- n. pazienti in day hospital con cartella clinica in stato aperto: 1035.

Conclusioni

La ricerca internazionale ha mostrato come la bioinformatica sia divenuta un elemento fondamentale della ricerca biomedica. In analogia con quanto avviene nel campo delle scoperte medico-biologiche, la sfida attuale è di fornire non solo ai ricercatori ma anche ai clinici strumenti informatici avanzati che permettano di

“tradurre” i risultati della ricerca di base in soluzioni utili alla loro attività di cura dei pazienti.

Il progetto i2b2-Pavia vuole raggiungere questo importante obiettivo mediante la creazione di un'infrastruttura informatica che funga da aggregatore ed analizzatore dei dati dei pazienti e che permetta sia di effettuare analisi retrospettive che di programmare studi prospettici.

Le prossime attività del progetto riguarderanno infatti il collegamento di i2b2 con la biobanca della Fondazione S. Maugeri, per realizzare un sistema informatico avanzato a supporto della ricerca oncologica che rappresenti un riferimento per la realtà italiana.

Bibliografia

1. Butte AJ. Translational bioinformatics: coming of age. *J Am Med Inform Assoc.* 2008; 15 (6): 709-714.
2. Butte AJ. Translational bioinformatics applications in genome medicine. *Genome Med.* 2009; 1 (6): 64.
3. Ciccarese P, Wu E, Kinoshita J, Wong G, Ocana M, Ruttenberg A, Clark T. The SWAN biomedical discourse ontology. *J Biomed Inform.* 2008; 41 (5): 739-751.
4. Cimino JJ, Hayamizu TF, Bodenreider O, Davis B, Stafford GA, Ringwald M. The caBIG terminology review process. *J Biomed Inform.* 2009; 42 (3): 571-580.
5. Kimball R, Ross M. *The Data Warehouse Toolkit*, 2002, John Wiley and Sons.
6. Larizza C, Milani G, Rojas Barahona LM, Guaschino E, Cereda C, Sances G, Bellazzi R. The i2b2-Pavia project: integrating clinical and research data for studying severe headaches. *AMIA 2009* (abstract).
7. Louie B, Mork P, Martin-Sanchez F, Halevy A, Tarczy-Hornoch P. Data integration and genomic medicine. *J Biomed Inform.* 2007; 40 (1): 5-16.
8. McConnell P, Dash RC, Chilukuri R, Pietrobon R, Johnson K, Annechiarico R, Cuticchia AJ. The cancer translational research informatics platform. *BMC Med Inform Decis Mak.* 2008; 8: 60.
9. Murphy SN, Mendis M, Hackett K, Kuttan R, Pan W, Phillips LC, Gainer V, Berkowicz D, Glaser JP, Kohane I, Chueh HC. Architecture of the open-source clinical research chart from Informatics for Integrating Biology and the Bedside. *AMIA Annu Symp Proc.* 2007; 548-552.
10. Murphy S, Churchill S, Bry L, Chueh H, Weiss S, Lazarus R, Zeng Q, Dubey A, Gainer V, Mendis M, Glaser J, Kohane I. Instrumenting the Health Care Enterprise for Discovery Research in the Genomic Era. *Genome Res.* 2009; 19 (9): 1675-1681.
11. Nagl S. A path to knowledge: from data to complex systems models of cancer. In: Nagl S, ed. *Cancer bioinformatics: from therapy design to treatment.* Wiley, London, UK. 2006; 3-28.
12. Nuzzo A, Riva A. Genephony: a knowledge management tool for genome-wide research. *BMC Bioinformatics* 2009; 10: 278.

13. Nuzzo A, Riva A, Bellazzi R. Phenotypic and genotypic data integration and exploration through a web-service architecture. *BMC Bioinformatics* 2009 (in press).
14. Roberts A, Gaizauskas R, Hepple M, Guo Y. Mining clinical relationships from patient narratives. *BMC Bioinformatics*. 2008; 9 (Suppl) 11: S3.
15. Romano P, Crescenzi M, The network for oncology bioinformatics of italian comprehensive cancer centers, ECCB 2008 & BITS 2008 Joint Conference, Cagliari September 21-26, 2008.
16. Roos M, Marshall MS, Gibson AP, Schuemie M, Meij E, Katrenko S, van Hage WR, Krommydas K, Adriaans PW. Structuring and extracting knowledge for the support of hypothesis generation in molecular biology. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10 (Suppl 10): S9.
17. Shah NH, Jonquet C, Chiang AP, Butte AJ, Chen R, Musen MA. Ontology-driven indexing of public datasets for translational bioinformatics. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10 (Suppl) 2: S1.

MECCANISMI DELLE METASTASI

Successione dei meccanismi molecolari e cellulari della diffusione metastatica

Umberto Magrini

Dipartimento di Patologia Umana ed Ereditaria, Sezione di Anatomia Patologica, Università di Pavia

La conoscenza del processo di metastatizzazione è di grande rilevanza se si tiene presente che il 90% della mortalità per cancro è legata alle metastasi e non al tumore primario. Recenti conoscenze in tema di meccanismi biomolecolari di metastatizzazione e sul ruolo delle cellule staminali cancerose (CSC) nello sviluppo delle metastasi, aprono nuove prospettive terapeutiche.

La “cascata metastatica” comprende una successione di eventi:

- invasione della matrice extracellulare e migrazione;
- penetrazione nei vasi;
- circolazione;
- uscita dai vasi;
- colonizzazione ed angiogenesi.

Di seguito vengono illustrati i dati più significativi e di recente acquisizione, sulle tappe della metastatizzazione.

Invasione della matrice extracellulare (ECM) e migrazione

Le cellule dei carcinomi (90% dei tumori umani) seguono, nel processo di invasione le seguenti tappe:

- distacco cellulare dal tumore primario;
- legami con ECM;
- degradazione di ECM;
- migrazione.

Il distacco dal tumore primario prende inizio da una diminuita espressione, da parte della cellula cancerosa (CTM), di molecole di adesione quali la caderina E (gene CDH-1) che stabiliscono legami omeotipici tra le cellule epiteliali. La porzione citoplasmatica delle caderine, attraverso la β -caderina, si lega all'actina citoplasmatica componente del citoscheletro. Mutazioni che alterano la sintesi o la funzione delle caderine E o della β -caderine o di altre molecole di adesione

quali NCAM (Normal Cell Adhesion Molecule) condizionano una accentuata invasività tumorale.

Il superamento della membrana basale (MB) coinvolge legami mediati da recettori, con laminina e fibronectina. I recettori sono espressi su tutta la superficie cellulare e non in forma polarizzata come nella cellula epiteliale normale. Al distacco cellulare segue degradazione enzimatica della MB e di ECM mediata da proteasi (metallo-proteinasi) secrete dal tumore stesso e da elementi stromali e del sistema monocito-macrofagico. Il collagene IV, componente delle MB degli epite- li e dei vasi viene scisso ed i prodotti di degradazione, sia del collagene che dei proteoglicani, inducono angiogenesi. Nello stesso tempo vengono prodotti anche fattori anti-angiogenetici (endostatine, tumstatine) e chemochine, piccole molecole (8-14 KDa) che inducono la migrazione e agiscono come fattori di "homing". La **migrazione** delle CTM comporta la formazione di uno pseudopodo contenente actina sul fronte di avanzamento, aderente focalmente alla matrice per azione di integrine. La molecola CD44, una glicoproteina transmembrana, agisce come recettore per l'acido ialuronico e per numerose altre molecole della matrice. Il dominio intracitoplasmatico di CD44 interagisce con l'actina del citoschele- tro promuovendo migrazione ed invasione. L'espressione sulle cellule di alcuni tumori di CD44 si correla strettamente con il potenziale metastatico e con la prognosi. Per degradazione della matrice da parte delle metalloproteinasi e di serina- esterasi (attivatore del plasminogeno) si formano cunicoli entro i quali avviene l'avanzamento cellulare per contrazione dei filamenti di actina causata dalla proteina motrice delle cellule non muscolari, la miosina II. La migrazione può avvenire per singole cellule, gruppi di cellule o filiere. È intuitivo che la migrazione a singole cellule si associa ad una maggiore capacità di diffusione. La velocità di migrazione di CTM "in vitro" è di 0,1-2 $\mu\text{m}/\text{min}$. Le cellule neoplastiche di deri- vazione epiteliale possono, lungo il processo di metastatizzazione, perdere le caratteristiche fenotipiche epiteliali ed assumere un fenotipo mesenchimale (Epithelial-Mesenchymal Transition = EMT).

La transizione epiteliale-mesenchimale è ben nota in campo embriologico in quanto essenziale al rimodellamento embrionario. Il processo EMT, in condizio- ni fisiologiche, segue una serie di tappe:

- perdita di molecole di adesione caratteristiche delle cellule epiteliali (caderine) e acquisizione di marcatori mesenchimali (vimentina);
- perdita della polarizzazione baso-apicale con acquisizione di polarità legata al movimento cellulare;
- rimodellamento del citoscheletro con modificazioni delle molecole di actina;
- alterazioni dell'adesione cellula-matrice con attivazione di enzimi proteolitici (metallo-proteinasi).

È del tutto evidente come il processo di metastatizzazione riecheggi in larga misura queste tappe. I fattori che intervengono nell'attivazione di EMT in corso di metastatizzazione sono rappresentati dal fattore trasformante β (TGF- β), da piccoli RNA che regolano i repressori trascrizionali delle caderine-E e dal microambiente (matrice, fibroblasti, miofibroblasti, cellule del sistema immuni- tario e monocito-macrofagico, fattori solubili).

Le CTM andate incontro a EMT sviluppano particolare invasività e chemioresistenza.

Il processo EMT è reversibile e le CTM possono andare incontro a **trasformazione mesenchimale-epiteliale (MET)** riassumendo il fenotipo epiteliale. I dati riportati derivano in larga misura da studi sperimentali, mentre non vi è un altrettanto chiaro riscontro in patologia umana. La difficoltà di individuare EMT sui preparati istologici umani comprendenti metastasi viene attribuita alla eterogeneità spaziale (piccola quota di cellule trasformate) e temporale (trasformazione frazionata nel tempo) del fenomeno, alla riacquisizione di fenotipo epiteliale ed alla difficoltà di distinguere, nel fronte di avanzamento del tumore le CTM con fenotipo mesenchimale dalle cellule dello stroma circostante. Futuri obiettivi, in questo campo sono:

- la possibilità di identificare agevolmente le cellule in trasformazione;
- la definizione del ruolo prognostico delle stesse;
- la possibilità di un blocco terapeutico del processo.

Penetrazione nei vasi e circolazione

Il superamento, mediato da proteasi, delle MB capillari e l'adesione alle cellule endoteliali consente il passaggio delle CTM nel circolo ematico e linfatico.

Le CTM in circolo sono particolarmente vulnerabili per la presenza di elementi del sistema immunitario, per la apoptosi intravasale ("anoikis"), per l'alta tensione di ossigeno.

Alcune CTM superano la tossicità ambientale creando legami omeotipici (tra loro) ed eterotipici (in particolare con le piastrine). La fuoriuscita dei vasi comporta adesione all'endotelio e superamento della MB con gli stessi meccanismi sviluppati nella invasività in senso inverso.

La **sede di arresto** delle CTM è condizionata da **cause meccaniche**, cioè da formazione di metastasi a livello dei filtri capillari incontrati (fegato, polmone) che variano in dipendenza dalla sede del tumore primario, o da **organotropismo**. L'organotropismo delle metastasi deriva dalla espressione di molecole di adesione da parte degli endoteli di letti vascolari diversi, da espressione di recettori (es. CLXCR4 e CCR7 su cellule del carcinoma mammario) per chemochine presenti in alta concentrazione in organi bersaglio, per secrezione da parte di organi bersaglio di chemioattivatori (es. fattori di crescita "insulin-like" I e II) di cui le CTM possiedono il recettore specifico.

Raggiunto un determinato "homing", la progressione della neoplasia è influenzata dalle modificazioni del microambiente stromale e dall'angiogenesi che modula l'entità della proliferazione, l'invasività ed il potenziale per ulteriori diffusioni metastatiche.

La diffusione per via linfatica coinvolge, in prima istanza, le stazioni loco-regionali con formazione di metastasi di varia grandezza (sub-micrometastasi, micrometastasi, macrometastasi) e di diverso significato prognostico. Se il linfonodo viene superato, le CTM seguendo le vie efferenti raggiungono il dotto toracico e quindi si versano nel torrente circolatorio.

Colonizzazione e angiogenesi

È dimostrata una interazione bidirezionale tumore-stroma mediata da fattori di crescita, citochine, chemochine e altri fattori solubili.

I fibroblasti stromali si trasformano in miofibroblasti, attivi nella produzione di fattori di crescita, di enzimi proteolitici e di componenti della matrice (tenascina, fibronectine oncofetali) che facilitano la migrazione delle CTM rendendo la matrice più fluida.

Le CTM producono fattori angiogenetici (VEGF ed altri) inducendo neovascolarizzazione ematica e linfatica, quest'ultima specie all'interfaccia tra tumore e tessuto sano. Da notare, come già accennato, che vengono prodotti anche molecole con azione inibitoria (trombospondina-1 e "statine", derivanti da clivaggio del plasminogeno e del collagene).

Un ruolo determinante viene attribuito alla neoangiogenesi nella riattivazione di cellule metastatiche "dormienti" per anni.

Si realizzerebbe, in altri termini, uno "switch" angiogenico con la formazione di una "nicchia vascolare" attorno alle CTM dormienti.

Una influenza molto discussa è svolta dagli infiltrati infiammatori presenti nello stroma attorno alle CTM. Gli elementi infiammatori (cellule T, NK, macrofagi) possono distruggere le CTM ma possono anche favorirne la progressione attraverso la produzione di fattori di crescita, di fattori angiogenetici e di proteasi.

L'organo di origine di una metastasi, può essere individuato con la dimostrazione, in campo immunoistochimico, di marcatori antigenici costituiti da proteine specifiche, ormoni, recettori, fattori di trascrizione nucleare.

Il sistema di stadiazione di una neoplasia è basato sulle dimensioni del tumore (T), sulla diffusione metastatica ai linfonodi (N), sulle metastasi a distanza (M). Il sistema TNM (<http://www.uicc.org>) è il metodo di stadiazione riconosciuto dall'Unione Internazionale contro il Cancro (UICC) e dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Cellule staminali cancerose e metastatizzazione

Il processo di metastatizzazione è relativamente inefficiente. Da una neoplasia di 1 cm di diametro (10^9 cellule) circa il 10^6 cellule divengono invasive ma il numero di micrometastasi che si forma è che dà origine a tumori secondari è (fortunatamente) limitato.

Appare quindi evidente che non tutte le cellule neoplastiche esprimono le stesse capacità metastatiche. In effetti un tumore solido è eterogeneo nella sua composizione: accanto a cellule cancerose che proliferano attivamente, ma non indefinitamente, vi è una quota di cellule staminali cancerose (CSC) dotate di capacità di divisioni asimmetriche (auto-rinnovamento e differenziazione) e di alto potenziale replicativo. L'opinione più accreditata è che una micrometastasi, per progredire, abbia bisogno di avere al suo interno almeno una CSC.

Le attuali chemioterapie, indirizzate contro cellule attivamente proliferanti, non agiscono sulle CSC, dotate di basso indice mitotico, di sistemi di chemioresi-

stenza e insensibili ai meccanismi di apoptosi e quindi fonti di recidive e di metastatizzazione. Lo studio del “profilo genico” del tumore primario e delle metastasi dimostra, in molti casi, che un “profilo metastatico” è già presente nelle fasi iniziali della neoplasia. Questa osservazione ha notevole interesse pratico nel senso che consente di applicare chemioterapie aggressive mirate fin dalle fasi precoci della neoplasia. Alcuni farmaci agiscono sulle CSC, quali il rituximab (anti-CD20) e la ciclopamina (CSC del glioblastoma).

Bibliografia essenziale

1. Leber MF, Effeth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (Review). *Int J Oncol* 2009; 34: 881-895.
2. Makrilia N, et al. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer, *Cancer Invest.* 2009; 27: 1023-1037.
3. Masaki I, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci.* 2010; 101: 293-299.
4. Moserle L, et al. The angiogenic switch: implications in the regulation of tumour dormancy, *Curr Mol Med.* 2009; 9: 135-941.
5. Gao D, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumour, growth and metastatic progression. *Bioch Biophys Acta.* 2009; 1796: 3-40.

The MET oncogene and cancer stem cell invasive growth

Carla Boccaccio

Institute for Cancer Research and Treatment IRCC, Department of Oncological Sciences,
Università di Torino

Tumor therapy must eradicate cancer stem cells

Experimental evidence accumulated in recent years convincingly supports the notion that human tumors contain a cell hierarchy. At the top of this hierarchy resides an often tiny subpopulation of “tumor initiating cells” or “cancer stem cells” (CSCs), which retain self-renewing and tumorigenic potential. CSCs generate the heterogeneous tumor bulk, containing an often prominent population of cells that have lost self-renewing capacity and are therefore deprived of tumorigenic properties. The majority of leukemias and solid tumors obey to this model, at least when challenged through a standard methodology that includes (i) separation of the tumor bulk in cell subpopulations by means of cell surface markers, and (ii) xenotransplantation of the selected subpopulations in immunocompromised mice (1). For instance, in human colorectal cancer, the surface marker CD133 has been used to isolate cancer stem cells from tumor samples. The CD133+ subpopulation, unlike the CD133-, displayed the ability to form tumors in the mouse, which recapitulate the histological features of the tumors of origin. Importantly, CD133+ could be isolated from the xenotransplant, and stably regenerate the tumor on serial transplantation (2).

The above model implies that CSCs must be eradicated in order to cure the tumor (3). However, CSCs display resistance to conventional therapies that are effective against the tumor bulk, providing an explanation for relapse in patients where the tumor regresses to a size undetectable to current diagnostic tools (4). The mechanisms supporting CSC resistance to therapy include: (i) expression of multi-drug resistance membrane transporters, which extrude chemicals from the cell; (ii) inherent resistance to proliferation-targeting agents, due to CSC mitotic quiescence; (iii) high resistance to oxidative DNA damage; (iv) enhanced ability to activate DNA repair machinery in response to chemotherapeutic agents and ionizing radiations (for a review see (5)).

In glioblastoma, it has been shown that therapeutical doses of ionizing radiation destroy the majority of cancer cells lacking stem properties, but positively select the CSC subset, leaving intact its clonogenic and tumorigenic potential (6).

Similar results were obtained by irradiating breast CSCs *in vitro* (7). It has been shown that CSCs undergo DNA damage as well as their non-stem counterpart, but they are more efficient in repairing strand breaks, through activation of DNA-damage checkpoint mechanisms regulated by the protein kinase ATM (8).

Remarkably, CSCs may also be resistant to therapies directed towards specific genetic lesions. This is the case of chronic myeloid leukemia, caused by a chromosomal translocation generating the fusion gene BCR-ABL. Although this translocation occurs in the CSC compartment, the Bcr-Abl protein is critical for controlling proliferation only in the downstream progenitor compartment. Thus, the Bcr-Abl targeting drug Imatinib is effective in eradicating all leukemic cells with the exception of the CSC compartment, resulting in leukemia restraint, but not in cure (9). As a further consequence, surviving cells undergo selective pressure that promotes the onset of new mutations.

In conclusion, to test the effectiveness of a new anti-cancer therapeutical protocol, it is crucial to investigate its activity on CSCs *in vitro* and *in vivo*. In the case of targeted therapies, it is mandatory to verify (i) whether the molecular target is expressed in the CSC subset, and (ii) which is the effect of the targeting drug on CSCs.

MET is expressed by stem cells and cancer stem cells

The MET oncogene encodes the tyrosine kinase receptor for Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF) and drives a genetic programme defined as “invasive growth” (IG). This programme instructs cells to dissociate one from each other through downregulation of cell junctions, to digest and penetrate the basement membrane, and to migrate through extracellular matrices. The IG programme also provides protection from growth arrest and apoptosis, which usually occur when cells are removed from their native environment (10). Although seemingly disruptive for tissue structure and function, IG is a physiological programme performed by stem and progenitor cells throughout embryonic development. For instance, during gastrulation, cells must migrate in an organized manner, proliferate and rearrange in order to transform a flat bidimensional embryo into a tridimensional organism. This process is orchestrated by the organizing areas of the embryo, such as the Hensen’s node, through secretion of soluble signals that include HGF/SF. This complex name originates from the independent discovery of the effects of this molecule on epithelial cells: proliferation on the one hand, dissociation and spreading, that is “scatter”, on the other. Moreover, when administered to epithelial cells cultured in a tridimensional matrix, HGF/SF induces “branching morphogenesis”, a process that recapitulates the development of ample ductal structures in epithelial organs such as liver, pancreas, lung, kidney, salivary and mammary glands. Moreover, *in vitro*, HGF/SF can induce various epithelial cell types to form the corresponding organoid (11).

Interestingly, in mature tissues, expression of MET is confined to the stem/progenitor cell compartments. This is observed in epithelia of the gastrointestinal tract, as well as in skeletal and cardiac muscle and in bone marrow. Remarkably, in the bone marrow the HGF/SF receptor is expressed by hemopoietic stem/prog-

enitor cells and by a subset of precursor cells distinct from the hemopoietic lineage. The latter are mobilized by, and migrate towards, HGF gradients generated by damaged tissues, such as liver, myocardium and nervous tissue, thereby contributing to tissue repair (11).

In experimental settings *in vitro* and *in vivo*, MET oncogenic activation induces cell transformation and deregulated execution of the IG programme, leading to cancer invasion and metastasis. Consistently, in collection of human tumor samples, the MET oncogene has been found affected by activating mutations, or, more often, overexpressed in the absence of genetic lesions. MET overexpression is often associated to aggressive/undifferentiated tumors.

Recently, we have found that MET is expressed also in CSCs isolated from human colorectal cancer and glioblastoma, and it is downregulated through transcriptional mechanisms during *in vitro* differentiation. We have also shown that activation of MET signaling in CSCs promotes *in vitro* invasiveness, indicating that, *in vivo*, MET activation can support CSC migration towards distant organs and growth of secondary tumors. Interestingly, the MET prometastatic ability can be completely independent of MET transforming ability, which is the distinguishing property of activated oncogenes. Another oncogenic event can cause transformation of a stem/progenitor cell into a CSC, and support expansion of the CSC compartment. However, as CSCs have inherited MET from their normal progenitor, they will be sensitive to HGF/SF. This is present in the extracellular matrix surrounding the tumor; moreover it is expressed by specific tissues such as the liver, or it can be expressed by injured tissues during inflammatory and/or

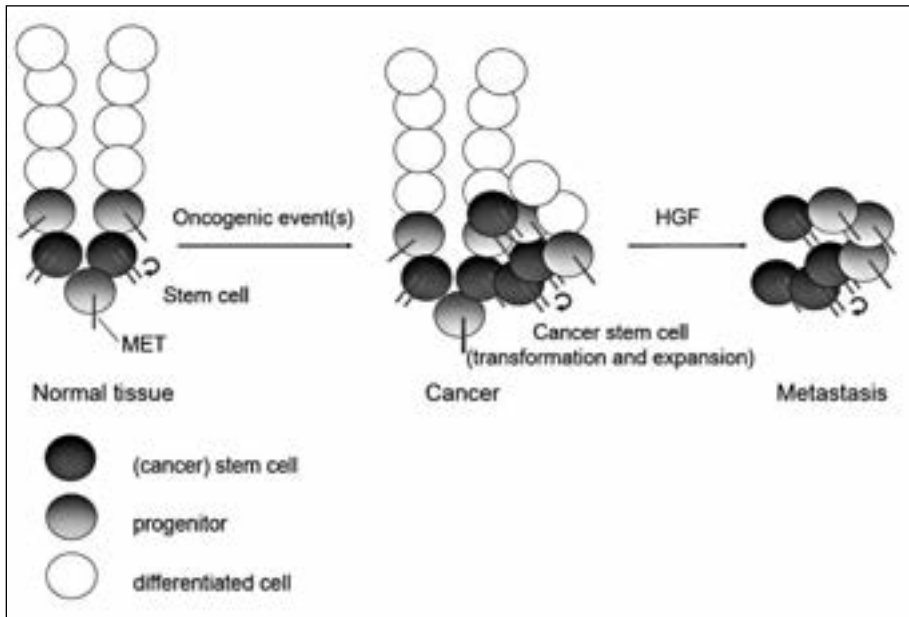


Fig. 1

regenerative processes. Released in the blood circulation, HGF/SF can form gradients that guide CSCs towards a secondary location (Fig. 1).

Met inhibition can sensitize cancer stem cells to radiotherapy

We have recently reported that MET is a prominent target of the ATM-NF- κ B pathway activated by cell irradiation. Being a powerful anti-apoptotic gene, MET is an important regulator of the survival and regenerative program (largely overlapping with physiological invasive growth), executed in response to radiation-induced damage. We have also shown that MET fosters invasion of irradiated cancer cells, and turns the MET-driven physiological branching morphogenesis into an aberrant pro-invasive process. Conversely, abrogation of MET expression, or inhibition of its kinase activity by specific drugs, counteract radiation-induced invasiveness, promote apoptosis and prevent cells from resuming proliferation after irradiation in vitro. Administration of MET inhibitors enhance radiotherapy efficacy on human tumor cell line transplanted in mice. Ongoing work suggests that MET inhibition in glioblastoma can overcome radioresistance not only of the tumor bulk, but also of CSCs.

References

1. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007; 58: 267-284.
2. Huang EH, Wicha MS. Colon cancer stem cells: implications for prevention and therapy. *Trends Mol Med.* 2008; 14: 503-509.
3. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 2008; 112: 4793-4807.
4. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 275-284.
5. Zhou BB, et al. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anti-cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8: 806-823.
6. Bao S, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006; 444: 756-760.
7. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98: 1777-1785.
8. Eyler CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2839-2845.
9. Graham SM, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood.* 2002; 99: 319-325.
10. Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer.* 2002; 4: 289-300.
11. Boccaccio C, Comoglio PM. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 637-645.

Il ruolo del microambiente nello sviluppo dei tumori

Ugo Cavallaro

FIRC Istituto di Oncologia Molecolare, IFOM-IEO Campus, Milano

Nel campo dell'oncologia molecolare, la maggior parte degli studi effettuati fino a pochi decenni fa si è concentrata sulla comprensione dei meccanismi intrinseci alle cellule tumorali che presiedono alla loro trasformazione neoplastica e alla successiva proliferazione incontrollata. Nonostante questo approccio abbia portato ad importanti scoperte e ad indubbi progressi anche in ambito terapeutico, esso ha sofferto di una notevole limitazione, vale a dire la scarsa attenzione alle interazioni tra le cellule cancerose e il loro microambiente. Quest'ultimo è invece diventato oggetto di molte ricerche negli ultimi anni, e ciò ha portato alla conclusione che lo stroma gioca un ruolo primario in tutte le fasi della progressione neoplastica.

Lo stroma tumorale è un tessuto estremamente eterogeneo di cui fanno parte sia diversi tipi cellulari (endotelio vascolare, leucociti, fibroblasti, cellule nervose, etc.) che una miriade di fattori solubili (fattori di crescita, citochine, chemochine) e componenti strutturali (matrice extracellulare). La composizione del microambiente tumorale e, di conseguenza, le sue proprietà funzionali variano notevolmente sia in base al sito della lesione neoplastica che al tipo di cancro in oggetto. Inoltre, si tratta di un tessuto altamente dinamico, la cui fisiopatologia è soggetta a continue alterazioni dovute al processo di carcinogenesi e alla progressione tumorale. Infatti, la principale connotazione dello stroma tumorale è una continua interazione con le cellule cancerose, interazione che è assolutamente bidirezionale. In questo contesto, è emblematico il fatto che, nel corso dello sviluppo tumorale, la componente stromale subisce una serie di alterazioni che spesso portano alla creazione di un ambiente favorevole alla crescita della massa cancerosa.

Un esempio tipico è rappresentato dalla formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi), che non solo permette l'apporto di ossigeno e nutrienti alle cellule cancerose, ma fornisce loro la principale via di disseminazione metastatica. L'angiogenesi tumore-associata è soggetta al controllo di vari fattori solubili (per esempio il VEGF e il bFGF) che sono solitamente abbondanti nel microambiente tumorale. È interessante che nel sistema stroma/tumore le cellule cancerose

non rappresentino l'unica fonte di fattori angiogenici. Questi ultimi, infatti, vengono prodotti anche da cellule del comparto ematopoietico che infiltrano la lesione neoplastica e fanno parte della risposta infiammatoria che caratterizza l'insorgenza e/o lo sviluppo di vari tipi tumorali. Oltre a sostenere il processo di neovascolarizzazione, l'infiltrato infiammatorio fornisce alle cellule tumorali anche un supporto diretto per la loro proliferazione e sopravvivenza, attraverso la produzione di citochine e molecole che modulano tali eventi. A sostegno dell'importanza della risposta infiammatoria tumore-associata, basti ricordare come l'infiammazione cronica di un determinato organo (pancreas, fegato, stomaco, polmone) costituisca fattore di rischio per lo sviluppo di lesioni cancerose a carico dell'organo stesso. È altresì noto come l'instaurarsi di un processo infiammatorio in un tessuto affetto da patologie benigne o preneoplastiche favorisca la progressione e la disseminazione della malattia.

Un evento cruciale nella transizione di un tumore verso uno stadio più aggressivo è l'acquisizione di proprietà invasive da parte delle cellule cancerose. Anche in questo caso, il crosstalk tra le cellule neoplastiche e il loro microambiente è di fondamentale importanza. È sufficiente considerare, infatti, che la matrice extracellulare, un componente essenziale dello stroma, è il principale substrato delle proteasi secrete dal tumore nel corso del processo invasivo.

Analogamente alle interazioni cellula-matrice, la comunicazione diretta tra cellule cancerose e cellule stromali rappresenta anch'essa un'importante via di regolazione della progressione tumorale.

In particolare, le caratteristiche di eterogeneità e dinamicità del microambiente tumorale implicano un continuo adattamento e plasticità dei processi di adesione cellula-cellula. Essendo tali processi mediati da specifiche molecole di adesione, queste ultime emergono come importanti modulatori nell'ambito delle interazioni neoplasia/stroma. Il ruolo regolatorio delle molecole di adesione nel corso della progressione neoplastica ha assunto una rilevanza ancora maggiore in seguito alle diverse osservazioni che attribuiscono a tali molecole, oltre alla funzioni prettamente adesive, anche attività di trasduzione del segnale. La capacità di *signalling* delle molecole di adesione le inserisce a pieno titolo tra i fattori coinvolti direttamente nell'acquisizione di un fenotipo invasivo e metastatico da parte delle cellule tumorali, e le aggiunge alla serie dei potenziali bersagli per nuovi approcci di terapia molecolare.

La rilevanza clinico-biologica del crosstalk tra tumore e microambiente è dimostrata in modo evidente da almeno due osservazioni che emergono dall'analisi della letteratura scientifica degli ultimi decenni:

1. la generazione di una serie di appositi modelli preclinici allo scopo di studiare in dettaglio i meccanismi che regolano tale crosstalk;
2. la messa a punto di nuove strategie terapeutiche che hanno come bersaglio lo stroma tumorale o, in alcuni casi, la sua interazione con le cellule neoplastiche.

I primi risultati di questi recenti approcci biologici e clinici hanno ulteriormente confermato l'importanza del microambiente nello sviluppo tumorale, nonché offerto nuovi bersagli cellulari e molecolari in ambito terapeutico.

Bibliografia essenziale

1. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 118-132.
2. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 285-293.
3. Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009; 19: 298-309.
4. Pagè F, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Tartour E, Saute's-Fridman C, Fridman W-H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010; 29: 1093-1102.
5. Gordon MS, Mendelson DS, Kato G. Tumor angiogenesis and novel antiangiogenic strategies. *Int J Cancer*. 2010; 126: 1777-1787.

La nicchia vascolare dei tumori come bersaglio terapeutico di cellule CD34+ esprimenti TRAIL in combinazione con inibitori di AKT

Arianna Giacomini, Carmelo Carlo-Stella

Oncologia Medica, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori e Università degli Studi di Milano

L'angiogenesi tumorale è un processo fondamentale per la progressione di tumori solidi (1) come pure di tumori ematologici (2) e la sua induzione è mediata da svariate molecole pro-angiogeniche rilasciate sia dalle cellule tumorali che dalle cellule sane (3).

Storicamente la crescita di tumori solidi è stata descritta come un processo a due fasi, una fase avascolare ed una fase vascolare (4). Nella prima fase la lesione neoplastica è di piccole dimensioni (diametro inferiore ai 2 mm), riceve i nutrienti per diffusione e rimane dormiente raggiungendo uno stato stazionario tra proliferazione ed apoptosi. Nella seconda fase le cellule tumorali iniziano a duplicarsi in modo indiscriminato inducendo il processo di vascolarizzazione al fine di sopperire alla crescente richiesta di ossigeno e nutrienti (4). La transizione dalla fase avascolare a quella vascolare è determinata dal cosiddetto “switch angiogenico”, ossia dall'acquisizione da parte delle cellule tumorali di un fenotipo in grado di indurre lo sbilanciamento del rapporto tra fattori pro- ed anti-angiogenici promuovendo così il processo dell'angiogenesi tumorale (5, 6). Lo stadio finale nella progressione di un tumore è la metastasi. La neovascolarizzazione di un tumore primario aumenta la possibilità che le cellule neoplastiche entrino nella circolazione sanguigna e diffondano in altri organi ed è essenziale per la crescita di metastasi a distanza.

Come preannunciato nel 1971 da Folkman (7), oggi è ampiamente riconosciuto come l'endotelio appartenente al microambiente tumorale rappresenti un bersaglio chiave per la terapia del cancro. L'intensa attività di ricerca e di sviluppo in questo ambito ha portato all'identificazione di diversi agenti in grado di colpire la rete vascolare tumorale, alcuni dei quali sono attualmente in fase di studio clinico. In base al loro meccanismo d'azione possiamo suddividere questi nuovi agenti terapeutici in due categorie: agenti antiangiogenici e agenti antivasculari. I primi mirano ad interferire con lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni inibendo l'i-

nizio del processo angiogenico, mentre i secondi vanno a danneggiare la vascolatura tumorale pre-esistente (8, 9).

Cellule staminali geneticamente modificate rappresentano un approccio innovativo per veicolare molecole anti-tumorali specificamente alla rete vascolare tumorale ed al tessuto neoplastico (10, 11). In particolare, l'accessibilità, la facile manipolazione, la mancanza di immunogenicità di cellule CD34+ autologhe, le peculiari proprietà di homing e il tropismo in aree di attiva angiogenesi e crescita tumorale fanno delle cellule staminali emopoietiche CD34+ i candidati ideali per il trasporto sistemico di geni terapeutici in aree neoplastiche disseminate (12-14), consentendo al contempo il superamento di importanti limitazioni inerenti il profilo farmacocinetico di farmaci solubili non veicolati (13, 15, 16). Recentemente, abbiamo messo a punto una strategia anti-tumorale basata sull'uso di cellule staminali geneticamente modificate ed usate come effettori anti-

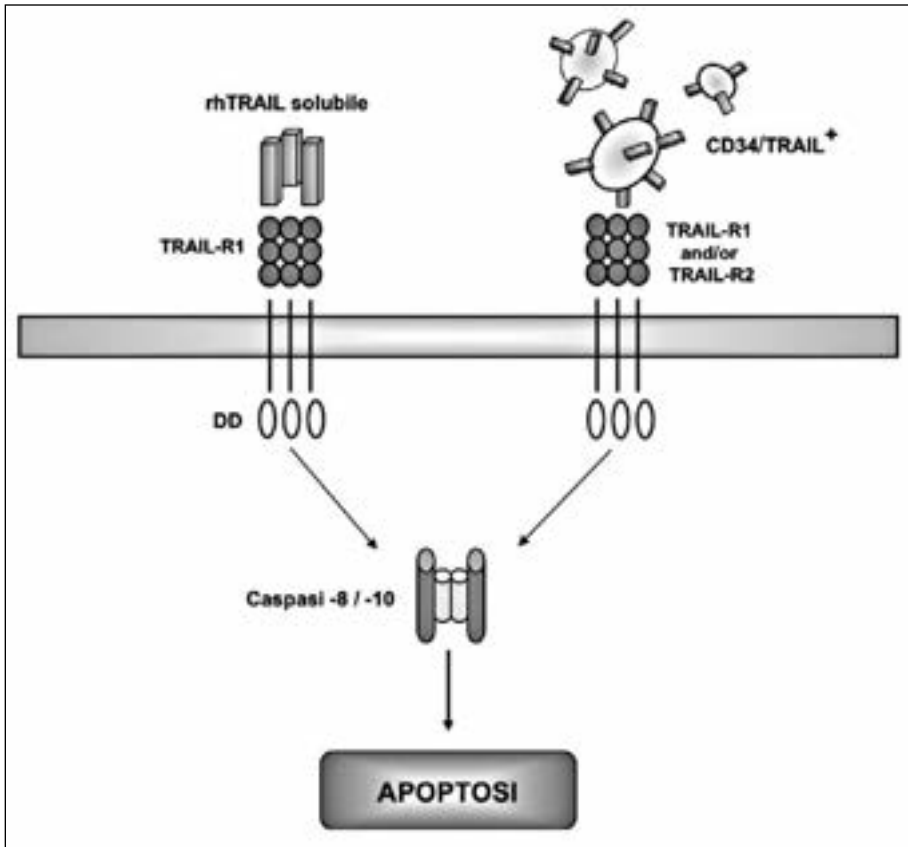


Fig. 1 - TRAIL solubile e cellule CD34-TRAIL+ (TRAIL di membrana) attivano la stessa via di trasduzione del segnale; tuttavia la molecola solubile è in grado di legare efficientemente solo il recettore TRAIL-R1, mentre la molecola di membrana è in grado di interagire efficientemente con entrambi i recettori (TRAIL-R1 e TRAIL-R2)20. DD= Death Domain.

tumorali per indirizzare la funzione pro-apoptotica di TRAIL (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) specificamente al tumore.

L'approccio si basa sulla somministrazione sistemica per via endovenosa di cellule staminali emopoietiche umane CD34+ ingegnerizzate con un vettore adenovirale ad esprimere TRAIL sulla loro membrana cellulare (CD34-TRAIL+) (17-19) (Fig. 1).

Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) è un membro della superfamiglia del TNF ritenuto un agente anti-cancro potenzialmente selettivo, poiché in grado di indurre in apoptosi una varietà di cellule cancerose, mentre non è citotossico per la maggior parte delle cellule normali (21-23). A dispetto dei promettenti dati preclinici, l'instabilità farmacologica e la particolare cinetica di rhTRAIL (emivita di 32 minuti), insieme con l'elevata frequenza di cellule cancerose resistenti all'apoptosi TRAIL-indotta, richiedono elevati dosaggi di proteina solubile per ottenere un efficace effetto farmacologico (24, 25). Ciò espone al rischio di tossicità epatica e cerebrale, che rappresenta il principale ostacolo all'applicazione clinica di TRAIL. L'esigenza di superare i limiti legati all'uso del ligando solubile ha portato alla ricerca di strategie alternative per la somministrazione di TRAIL a scopo terapeutico, basate sulla terapia genica.

Come abbiamo precedentemente dimostrato, TRAIL di membrana espresso da cellule CD34+ geneticamente modificate esercita in vitro una potente attività pro-apoptotica nei confronti di cellule tumorali di neoplasie ematologiche umane sia sensibili che resistenti alla proteina solubile TRAIL (sTRAIL) (18), rivelandosi del tutto efficace nel superare la resistenza alla molecola in forma solubile. In vivo, cellule CD34-TRAIL+ sono in grado di raggiungere efficientemente e selettivamente le sedi tumorali sfruttando le interazioni CXCR4/SDF-1 e VLA-4/VCAM-126 (Fig. 2), garantendo quindi l'espressione localizzata del transgene ed il raggiungimento di elevate concentrazioni del prodotto terapeutico a livello tumorale, limitando la dispersione e, di conseguenza, la tossicità in tessuti non-bersaglio.

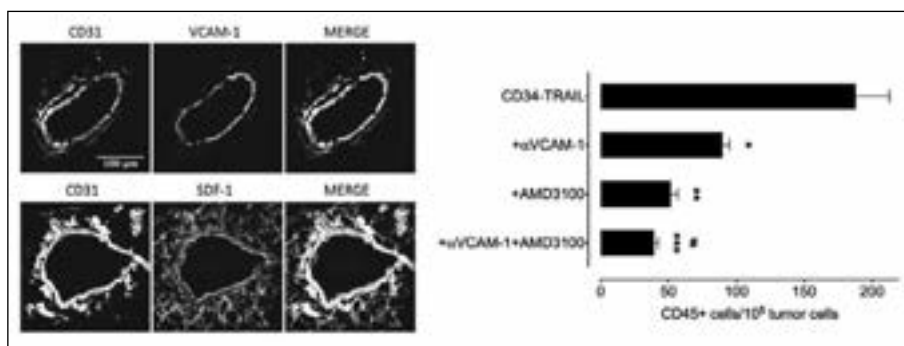


Fig. 2 - L'homing intra-tumorale di cellule CD34-TRAIL+ è mediato dall'interazione con la citochina SDF-1 e l'integrina VCAM-1 espresse dall'endotelio tumorale. A) Espressione in microscopia confocale di VCAM-1 e SDF-1 sull'endotelio tumorale esprimente CD31. B) Il trattamento in vivo con anticorpi anti VCAM-1 e anti CXCR4 (AMD3100) previene l'homing intratumorale di cellule CD34-TRAIL+ 26.

Inoltre, a differenza del TRAIL solubile, il quale esercita solo un'attività anti-tumorale diretta, cellule CD34-TRAIL+ attivano una complessa cascata di eventi aventi come bersaglio sia le cellule tumorali che la rete vascolare tumorale. Infatti, esse esercitano un'attività antitumorale diretta mediata dall'interazione cellula CD34-TRAIL+/cellula tumorale e un'attività anti-tumorale indiretta mediata da meccanismi di danno vascolare²⁶. In particolare, l'attività anti-vascolare di cellule CD34-TRAIL+ sfrutta l'interazione di TRAIL di membrana con il recettore TRAIL-R2 espresso dall'endotelio tumorale (Fig. 3); tale interazione induce in apoptosi le cellule endoteliali tumorali provocando l'insorgenza di vaste aree di necrosi emorragica nel tessuto tumorale a valle del vaso sanguigno danneggiato (26) (Fig. 4).

Da studi recentemente condotti è emerso come il pathway PI3K/AKT sia costitutivamente attivo non solo in svariate neoplasie umane, ma anche a livello dell'endotelio tumorale (27, 28). AKT attivato fosforila numerosi substrati coinvolti nella regolazione di importanti processi cellulari, tra cui il ciclo cellulare, la sopravvivenza e la crescita cellulare, la trascrizione e la traduzione proteica, l'omeostasi vascolare e l'angiogenesi, il metabolismo del glucosio e l'attività dei recettori ormonali (Fig. 5) (29).

È stato dimostrato che l'attivazione del pathway PI3K/AKT contribuisce alla resistenza tumorale a varie terapie e che l'inibizione dei componenti della via di traduzione del segnale di AKT è in grado di superare la resistenza alla chemioterapia, radioterapia, ormonoterapia e terapia con agenti a bersaglio (30). Inoltre, l'aumentata attivazione di AKT a livello dell'endotelio tumorale sarebbe in grado di aumentare la sopravvivenza e il fenotipo pro-angiogenico delle cellule endoteliali appartenenti al microambiente tumorale (28).

Recentemente abbiamo condotto uno studio in cui è emerso che l'inibizione del pathway di AKT mediata da Perifosina è in grado di aumentare sinergicamente l'attività antitumorale ed anti-vascolare di cellule CD34-TRAIL+. Perifosina, oltre ad inibire l'attivazione del pathway di AKT nelle cellule tumorali e nell'endotelio tumorale, sarebbe in grado di upregolare l'espressione di recettori di



Fig. 3 - Espressione in microscopia confocale di TRAIL-R2 sulle cellule endoteliali del tumore (TEC, Tumor Endothelial Cells).

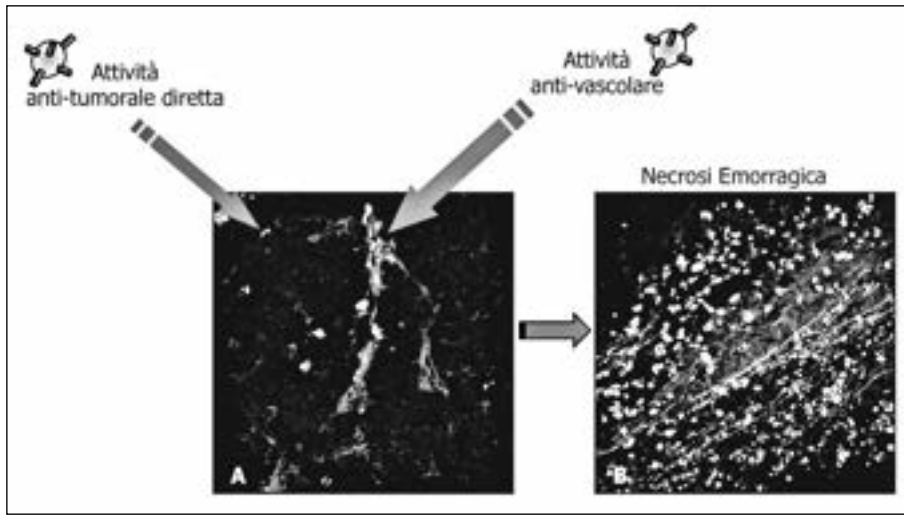


Fig. 4 - Cellule CD34-TRAIL+ esercitano un'attività anti-tumorale diretta mediata dall'interazione cellula CD34- TRAIL+/cellula tumorale e un'attività anti-tumorale indiretta mediata da meccanismi di tipo anti-vascolare (26). A) Cellule CD34-TRAIL+ inducono in apoptosi le cellule tumorali (verde= TUNEL+) e le cellule dell'endotelio tumorale (giallo= merge TUNEL+marcatore endoteliale). B) L'apoptosi delle cellule endoteliali tumorali indotta da TRAIL di membrana causa necrosi emorragica nel tessuto tumorale (verde= necrosi, TUNEL+; rosso= emazie).

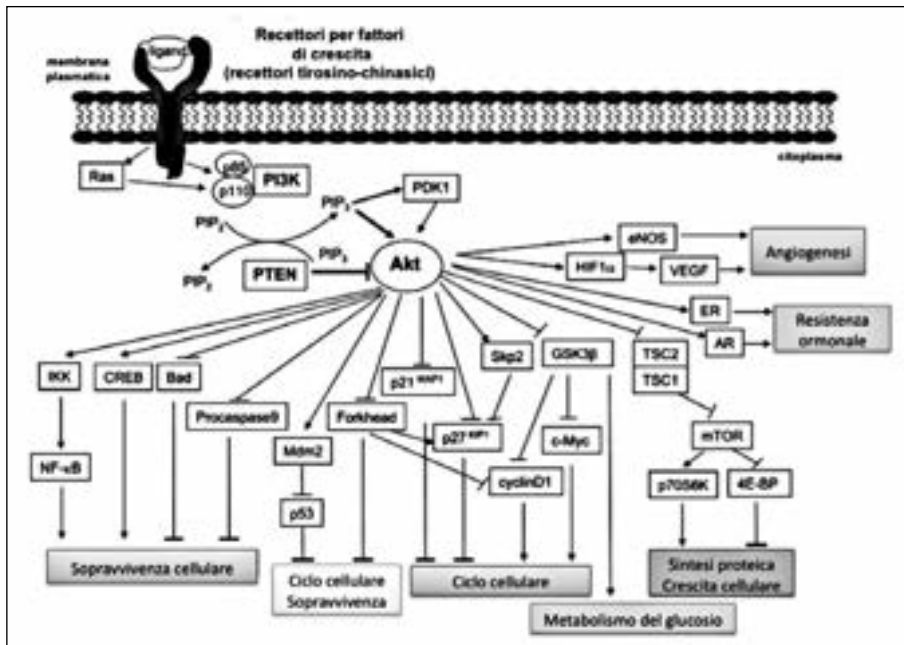


Fig. 5 - Schema della via di trasduzione del segnale PI3K/AKT. L'attivazione di AKT regola numerose funzioni cellulari, tra cui il ciclo cellulare, la sopravvivenza e la crescita cellulare, la trascrizione e la traduzione proteica, il metabolismo del glucosio, l'omeostasi vascolare e l'angiogenesi.

morte sulla superficie dell'endotelio tumorale, favorendo ulteriormente l'interazione cellule CD34-TRAIL+/TRAIL-R2 endoteliale. La combinazione di cellule CD34-TRAIL+ con Perifosina consentirebbe quindi di amplificare l'attività anti-tumorale di TRAIL di membrana e sensibilizzare all'attività anti-vascolare di cellule CD34-TRAIL+ tumori caratterizzati da una rete vascolare non esprimente death receptors.

Bibliografia

1. Soria JC, Fayette J, Armand JP. Molecular targeting: targeting angiogenesis in solid tumors. *Ann Oncol.* 2004; 15 (Suppl 4): iv223-227.
2. Moehler TM, Neben K, Ho AD, Goldschmidt H. Angiogenesis in hematologic malignancies. *Ann Hematol.* 2001; 80: 695-705.
3. Neufeld G, Kessler O. Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25: 373-385.
4. Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J. Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *Br J Cancer.* 1977; 35: 347-356.
5. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86: 353-364.
6. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 401-410.
7. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285: 1182-1186.
8. Siemann DW, et al. Differentiation and definition of vascular-targeted therapies. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 416-420.
9. Thorpe PE. Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 415-427.
10. Harrington K, et al. Cells as vehicles for cancer gene therapy: the missing link between targeted vectors and systemic delivery? *Hum Gene Ther.* 2002; 13: 1263-1280.
11. Introna M, Barbui AM, Golay J, Rambaldi A. Innovative cell-based therapies in oncohematology: what are the clinical facts? *Haematologica.* 2004; 89: 1253-1260.
12. Jin H, et al. A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest.* 2006; 116: 652-662.
13. Aboody KS, Najbauer J, Danks MK. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Ther.* 2008; 15: 739-752.
14. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* 2006; 107: 1761-1767.
15. Griffith TS, et al. TRAIL gene therapy: from preclinical development to clinical application. *Curr Gene Ther.* 2009; 9: 9-19.
16. Sasportas LS, et al. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 4822-4827.
17. Lavazza C, et al. Highly efficient gene transfer into mobilized CD34+

- hematopoietic cells using serotype-5 adenoviral vectors and BoosterExpress Reagent. *Exp Hematol.* 2007; 35: 888-897.
18. Carlo-Stella C, et al. Antitumor activity of human CD34+ cells expressing membrane-bound tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Hum Gene Ther.* 2006; 17: 1225-1240.
 19. Carlo-Stella C, Lavazza C, Carbone A, Gianni AM. Anticancer cell therapy with TRAIL-armed CD34+ progenitor cells. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 610: 100-111.
 20. Wajant H, et al. Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene.* 2001; 20: 4101-4106.
 21. Walczak H, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med.* 1999; 5: 157-163.
 22. Ashkenazi A, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest.* 1999; 104: 155-162.
 23. Gazitt Y. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 1999; 13: 1817-1824.
 24. Kelley SK, et al. Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299: 31-38.
 25. Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol.* 2008; 26: 3621-3630.
 26. Lavazza C, et al. Human CD34+ cells engineered to express membrane-bound tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) target both tumor cells and tumor vasculature. *Blood.* doi: 10.1182/blood-2009-08-239632, 2010.
 27. Phung TL, et al. Endothelial Akt signaling is rate-limiting for rapamycin inhibition of mouse mammary tumor progression. *Cancer Res.* 2007; 67: 5070-5075.
 28. Bussolati B, Deambrosio I, Russo S, Deregibus MC, Camussi G. Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells. *FASEB J* 2003; 17: 1159-1161.
 29. Tokunaga E, et al. Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008; 8: 27-36.
 30. Kim D, et al. AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance. *Front Biosci.* 2005; 10: 975-987.

**CELLULE STAMINALI
NELLE NEOPLASIE EMATOLOGICHE**

La cellula staminale leucemica e il suo microambiente nelle LAM

Paolo Bernasconi

Laboratorio di Citogenetica e Biologia Molecolare Ematologica, Divisione di Ematologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia

È ormai ben noto che la sopravvivenza a lungo termine e la capacità di auto-mantenersi della popolazione leucemica sono garantite da una piccola frazione di cellule chiamate “Cellule Staminali Leucemiche” (CSL). L’esistenza di tali cellule fu ipotizzata da McCulloch nel 1983 e venne successivamente confermata dalla citofluorimetria a flusso multiparametrica ad alta velocità. Infatti, lo studio immuno-fenotipico di sottopopolazioni cellulari ottenute da pazienti affetti da LAM e utilizzate per xenotrapianti in modelli sperimentali murini ha dimostrato che solo le cellule $CD34^+CD38^-$ sono clonogeniche, cioè capaci di generare leucemia se trapiantate nel topo NOD/SCID, e che è sufficiente una sola cellula $CD34^+CD38^-$ su un milione di cellule leucemiche per produrre la malattia (Lapidot et al., 1994; Bonnet & Dick, 1997). I progenitori commissionati $CD34^+$ e $CD38^+$ non sono clonogenici. Pertanto, anche l’ematopoiesi leucemica, come quella normale, è organizzata in modo gerarchico (Jordan, 2007; Lane et al., 2009). Rimangono invece da definire quali siano i meccanismi molecolari responsabili della capacità clonogenica della CSL e se questa caratteristica dipenda dal livello di staminalità della cellula colpita o dal tipo di lesione genica prodotta dall’evento leucemogeno (Harada et al., 2008; Bernasconi, 2008; Pedersen-Bjergaard et al., 2008). La rilevanza del difetto molecolare è stata sottolineata da vari studi. Taluni hanno dimostrato che alcune lesioni geniche (TLS-ERG, MOZ-TIF2, MLL-AF9, MLL-ENL), se introdotte in progenitori ematopoietici già commissionati, sono sufficienti a fare in modo che questi assumano le caratteristiche morfologiche e funzionali tipiche della CSL. Il gene di fusione MLL-AF9, ad esempio, introdotto in progenitori granulocito-macrofagici fa sì che questi mantengano il proprio profilo immunofenotipico e genico, ma presentino la riattivazione di un “subset” genico tipico della cellula staminale ematopoietica (CSE) normale (Kristov et al., 2006). Altri studi hanno invece dimostrato che per la trasformazione neoplastica è necessaria la cooperazione tra mutazioni di classe I, che hanno come bersaglio i geni (FLT3, RAS, KIT, ect.) coinvolti nella trasdu-

zione del segnale, e mutazioni di classe II, che hanno come bersaglio i geni che codificano per fattori di trascrizione (Deguchi & Gilliland, 2002).

La rilevanza del difetto molecolare è stata recentemente ribadita anche dagli studi che hanno analizzato l'importanza del microambiente midollare nella patogenesi delle LAM (Lane et al., 2009; Ayala et al., 2010). Questi studi hanno sottolineato che vi è una stretta e complessa interazione bi-direzionale tra CSL e microambiente midollare. Da un lato la CSL grazie alla propria lesione genica può sconfiggere i meccanismi omeostatici fisiologicamente operanti nella nicchia ematopoietica che diventa il luogo dove la CSL stessa si protegge dalla tossicità della chemioterapia, dall'altro il microambiente midollare fornisce fattori di crescita e chemochine in grado di garantire la sopravvivenza e talvolta anche una certa differenziazione della CSL (Wei et al., 2008). Inoltre, il fatto che le cellule endoteliali stromali, le cellule stromali e le cellule leucemiche spesso condividano le stesse lesioni geniche fa ipotizzare che siano tutte bersaglio dell'evento leucemogeno. La presente trattazione analizzerà la biologia cellulare e molecolare della nicchia ematopoietica normale e leucemica e le vie molecolari che svolgono un ruolo cruciale nella regolazione delle interazioni tra microambiente midollare e CSL. La conoscenza di questi complessi rapporti è indispensabile per sviluppare nuove terapie molecolari dirette a colpire non solo i difetti molecolari della CSL, ma anche quelli del microambiente midollare. Tra questi ultimi, quelli che coinvolgono il recettore chemokinico CXCR4, le molecole di adesione VLA4 e CD44 e le proteine ipossia correlate HIF-1 α e VEGF sembrano essere i più promettenti.

La nicchia ematopoietica normale

Il concetto di nicchia ematopoietica venne per la prima volta introdotto da Lord nel 1975. Più tardi studi condotti nella *Drosophila* confermarono l'esistenza della nicchia ematopoietica dimostrando che:

- 1) il numero di cellule staminali residenti nella nicchia è ben definito;
- 2) lo stato di cellula staminale è mantenuto grazie all'interazione con altre cellule;
- 3) il numero e le funzioni di cellule staminali sono mantenute e controllate da un corretto equilibrio tra segnali di inibizione e di stimolazione forniti dalla nicchia stessa;
- 4) alcune cellule normalmente non staminali acquisiscono il fenotipo staminale una volta che occupano la nicchia (Adams & Scadden, 2006).

Attualmente si riconoscono due tipi di nicchia: quella "osteoblastica" (endosteale) e quella "vascolare" (Perry e Li, 2007). Le due nicchie cooperano e sono tra loro molto strettamente collegate. La prima si trova in prossimità della superficie endosteale dell'osso trabecolare, contiene numerosi osteoblasti e ospita CSE CD150⁻ (solo il 14% di queste è CD150⁺) quiescenti, lentamente ciclanti e capaci di garantire l'ematopoiesi a lungo termine. La nicchia vascolare, formata dalle cellule sinusoidali endoteliali che rivestono i vasi sanguigni, contiene, promuove e partecipa attivamente alla differenziazione delle CSE CD150⁺ e CD48⁻ attivamente ciclanti e capaci di garantire l'ematopoiesi a breve termine. La stretta cooperazione tra le due nicchie, regolata da gradienti di ossigeno e di "fibroblast

growth factor 4 (FGF-4)”, controlla la capacità di “self-renewal”, di proliferazione, di differenziazione e di uscita ed entrata nel midollo osseo della CSE. Quest’ultima può abbandonare la nicchia endosteale, entrare nella nicchia vascolare e da questa passare nei vasi sanguigni. Successivamente, la CSE può passare dal sangue periferico alla nicchia vascolare grazie ad un processo di migrazione trans-endoteliale e dalla nicchia vascolare tornare ad occupare la nicchia endosteale. La stretta vicinanza di nicchie vascolari e endosteali, la presenza di CSE nelle vicinanze dell’endostio e dei sinusoidi ed il fatto che circa due terzi delle CSE si trovi in prossimità dei sinusoidi non supporta l’effettiva presenza di due tipi distinti di nicchia. Questa osservazione trova conferma nel fatto che l’endostio forma una superficie riccamente vascolarizzata a funzione altamente specializzata posta più spesso nelle vicinanze delle cellule pre-osteoblastiche N-caderina positive (Xie et al., 2009).

Come già detto, lo sviluppo della CSE è regolato dalle cellule stromali che producono citochine, chemochine e segnali intra-cellulari a loro volta prodotti da fenomeni di adesione cellulare. Le cellule stromali comprendono osteoblasti, osteoclasti, cellule endoteliali, cellule reticolari perivascolari e cellule mesenchimali, tutte ugualmente rilevanti per la normale omeostasi midollare (Morrison e Spradling, 2008). Tra queste cellule quella che svolge un ruolo rilevante nella omeostasi della nicchia è senza dubbio la cellula staminale mesenchimale che tuttora presenta caratteristiche biologiche e funzionali relativamente enigmatiche. Questa cellula, anche chiamata cellula aventiziale reticolare (CAR), esprime il CD146 ed il CXCL12 (anche chiamato “stromal-derived factor-1”, SDF-1), possiede la capacità di auto-mantenersi, risiede nella superficie sinusoidale, partecipa all’organizzazione della parete sinusoidale, produce angiopoietina-1 (Ang-1), e dà origine a osteoblasti e ad adipociti che formano la nicchia endosteale (Kiel et al., 2005). In modelli sperimentali murini di xenotrapianto la cellula aventiziale reticolare posta in vicinanza di vasi ed indotta ad esprimere il CXCL12 è in grado di ricreare il microambiente midollare (Sacchetti et al., 2007).

Anche gli osteoblasti svolgono importanti funzioni all’interno della nicchia (Calvi et al., 2003). Un aumento del loro numero, strettamente correlato ad un aumento delle dimensioni della nicchia e del numero di CSE, si verifica a seguito dell’attivazione della proteina paratormone correlata, che fa aumentare l’espressione di Jagged-1, il ligando di Notch-1. È stato anche osservato che ad un aumento degli osteoblasti fusati N-cadherina⁺/CD45⁻ corrisponde un aumento delle CSE perché tra le due cellule si verifica un’interazione mediata dal complesso N-cadherina/ β -catenina. La rottura di questo legame ad opera di metalloproteinasi provoca un aumento della concentrazione citoplasmatica di β -catenina con conseguente attivazione della via di segnale presieduta da Wnt che a sua volta induce un’ aumentata espressione di alcuni geni bersaglio tra cui quello della Ciclina D1 e *c-Myc*. Le vie di segnale presiedute da Wnt e Notch1 svolgono un ruolo molto importante perché controllano la funzionalità delle CSE. Mentre le proteine Wnt sono necessarie alla proliferazione ed ai programmi differenziativi della cellula, Notch1 blocca la differenziazione indotta da Wnt. A questo proposito è interessante segnalare che un inibitore di Wnt, il Dickkopf-1, siccome indu-

ce la perdita dello stato di quiescenza e della capacità di ripopolare la nicchia determina un esaurimento della CSE. Nonostante queste osservazioni le interazioni tra Notch1 e Wnt rimangono molto complesse anche perché non sono state chiarite dagli studi di ablazione genica che dovevano correlare la capacità di “self-renewal” della CSE con la capacità di garantire la ripresa dell’ematopoiesi a lungo termine e la possibilità di eseguire diverse procedure di trapianto. Sembra però che la modulazione delle vie di segnale presiedute da Wnt, Notch e Hedgehog, svolga un’azione di controllo nei confronti della divisione cellulare asimmetrica e sia quindi necessaria a mantenere stabile il pool di CSE ed a garantirne il “self-renewal”.

Le citochine e chemochine prodotte dalle cellule stromali midollari si concentrano in particolari nicchie a seconda della produzione locale e degli effetti del loro legame con i glicosio-amminoglicani. Tra questi ultimi il CXCL12 favorisce l’accesamento della CSE poiché fa aumentare l’espressione di “vascular cell adhesion molecole-1” (VCAM-1) e di “very late antigen-4 (VLA-4). Quest’ultimo è necessario per l’adesione della CSE alla matrice extracellulare dell’osso mediata dalla fibronectina. Inoltre, i livelli di espressione di CXCL12 e del ligando specifico, il CXCR4, variano a seconda delle oscillazioni circadiane del tono del sistema nervoso simpatico. L’espressione di CXCL12 si riduce durante il giorno e mentre quella di CXCR4 aumenta durante la notte. I “transforming growth factors”, la “Fms-like tyrosine-kinase 3” (Flt3), la Cdc42 Rho GTPasi, e la Ang-1 permettono alla CSE di rimanere quiescente. Per quanto riguarda l’Ang-1, una volta prodotta dagli osteoblasti essa si lega al proprio recettore Tie-2 che è dotato di attività tirosina chinasi. Il meccanismo con cui Tie-2 induce la quiescenza della CSE è ancora sconosciuto, ma si ritiene che quest’azione possa dipendere da una collaborazione tra Tie-2 e p21, l’inibitore delle chinasi ciclina dipendenti. Infatti, p21 coopera con c-Myc nel controllare lo stato della CSE. In particolare, c-myc blocca l’espressione di p21 ed induce la proliferazione della CSE; se invece l’espressione di c-myc viene bloccata i livelli di proteina p21 aumentano e la CSE diviene quiescente. Tra le altre citochine prodotte dalle cellule stromali bisogna ricordare lo “stem cell factor” e l’osteopontina. Quest’ultima modula la produzione di osteoblasti, si lega ai recettori di superficie della CSE, al CD44 ed alle integrine α_4 e $\alpha_5\beta_1$, ed infine determina la riduzione del numero di CSE nella nicchia. La sua assenza invece fa sì che il numero di CSE nella nicchia diventi sovra-fisiologico. Anche i livelli extracellulari di ione calcio sono importanti nel determinare il tipo di nicchia in cui risiede la CSE. La mancanza del recettore sensibile alle variazioni della concentrazione extracellulare di ione calcio identifica quelle CSE che non risiedono nel midollo osseo e non riescono a garantire l’attecchimento se trapiantate. Tuttavia, le CSE prive di recettore si accasano nello spazio perivascolare di midollo osseo e milza (Adams & Scadden, 2006).

La nicchia ematopoietica leucemica

Le cellule stromali midollari con la produzione di citochine e attraverso segnali intra-cellulari mediati dal contatto intercellulare promuovono la sopravvivenza e

la crescita delle cellule leucemiche e favoriscono la resistenza alla chemioterapia. Quest'ultima azione è raggiunta grazie all'attivazione di molecole ad azione anti-apoptotica. D'altra parte anche i meccanismi che regolano lo stato di quiescenza della CSE possono favorire l'acquisizione della chemioresistenza. La CSL presenta alcune caratteristiche della CSE normale, ma ne differisce per la proliferazione aberrante e per la capacità di invadere i vari tessuti. La sopravvivenza della CSL viene favorita dagli osteoblasti e dalla nicchia vascolare. È stato recentemente dimostrato che le CSL e le cellule CD34+ del cordone trapiantate nei topi NOG si localizzavano inizialmente nelle vicinanze degli osteoblasti della regione epifisaria e poi si espandevano nella regione più interna dell'osso ricca di vasi e nella diafisi. Tuttavia il fatto che l'accasamento e la proliferazione fossero più attivi nella regione epifisaria che in quella diafisaria faceva supporre che tra le due regioni vi fosse un gradiente di "vascular endothelium growth factor" (VEGF) che avvantaggiava la regione epifisaria. A distanza di otto settimane dal trapianto il numero di cellule leucemiche nei topi era aumentato del 50% e la maggior parte delle cellule leucemiche era localizzata nella regione delle epifisi. Dopo la somministrazione di citosina-arabinoside ad alte dosi, le cellule leucemiche residue formavano "clusters" ed erano adese ai vasi ed all'endostio, dato che faceva ipotizzare che la popolazione clonale potesse ricevere segnali anti-apoptotici non solo dagli osteoblasti ma anche dalle cellule endoteliali. Queste osservazioni indicano che il processo di leucemogenesi è da un lato determinato dalle caratteristiche biologiche che si sviluppano nella CSL per azione dell'evento leucemogeno e dall'altro dalla capacità della nicchia di fornire un'abbondante dose di fattori di crescita e di attivare meccanismi anti-apoptotici che favoriscono la sopravvivenza della CSL stessa. Recentemente sono stati descritti alcune alterazioni del microambiente midollare che sono necessarie o contribuiscono al processo di leucemogenesi. Un'alterazione del gene del retinoblastoma (Rb) determina un disordine mieloproliferativo cronico che può essere causato anche da un'alterazione del gene che codifica per il recettore gamma dell'acido retinoico (RAR γ) (Walkley et al., 2007). Nel topo la completa inattivazione del gene del retinoblastoma induce un'ematopoiesi extramidollare ed un disordine mieloproliferativo. Tuttavia, se sono le cellule mieloidi a presentare l'inattivazione la malattia mieloproliferativa non si sviluppa. Questa osservazione indica che nei topi con la mutazione il disordine mieloproliferativo è causato da un alterato rapporto tra i progenitori ematopoietici ed il microambiente midollare. Questa possibilità è stata confermata dai topi RAR $\gamma^{-/-}$ nei quali è la carenza di RAR γ a determinare la malattia mieloproliferativa. Infatti, tale alterazione è responsabile della deplezione di osteoblasti, dell'eccessiva ematopoiesi midollare e splenica, e della sede vascolare delle CSE. Queste alterazioni si verificano perché la carenza della proteina RAR γ fa sì che vengano persi i segnali di inibizione normalmente forniti dalla nicchia osteoblastica, alterazione responsabile dell'eccessiva proliferazione delle CSE. Una carenza della proteina codificata dal gene del retinoblastoma potrebbe avere gli stessi effetti.

L'importanza delle connessioni tra CSE e microambiente è ribadita dal fatto che un'inattivazione del gene PTEN ("phosphatase and tensin homolog") sia nelle

cellule del microambiente che nei progenitori ematopoietici determina una malattia mieloproliferativa che evolve in leucemia acuta (Yilmaz et al, 2006). Tuttavia se la delezione di PTEN è presente solo nei progenitori ematopoietici ma non nelle cellule del microambiente si osserva solo una deplezione di CSE. Pertanto, una mancata espressione di PTEN nelle CSE non è capace da sola di determinare una trasformazione neoplastica. Similmente, l'attivazione di NF κ B nelle cellule mieloidi e l'assenza del suo inibitore I κ B α non sono sufficienti ad indurre un aumento dei granulociti, ma se questi stesse alterazioni si verificano in un tessuto non ematopoietico, come ad esempio il fegato fetale, si osserva la comparsa di progenitori ematopoietici displastici ed una rapida evoluzione della displasia in LAM (Rupec et al, 2005). Quest'evoluzione è causata da una sovra-espressione di Jagged-1 negli epatociti perinatali I κ B α ^{Δ/Δ} e da una attivazione di Notch-1 nei neutrofili. Pertanto, in base a queste osservazioni un disordine ematopoietico pre-neoplastico può iniziare in un tessuto extra-ematopoietico formato da cellule che presentano l'inattivazione di I κ B α probabilmente prodotta dall'attivazione della via di segnale presieduta da Notch-1. Vari studi hanno dimostrato che quest'ultima via di segnale regola in modo molto preciso i rapporti tra CSE e microambiente e che il gene oncosoppressore Fbxw7, che è capace di ridurre i livelli di espressione delle proteine ciclina E, Notch-1 e c-myc, gioca un ruolo fondamentale nel mantenere quiescente la CSE (Matsuoka et al., 2008).

Le integrine

L'attacco delle CSL al microambiente midollare viene garantito dalle integrine. A questo proposito è stato suggerito che l'interazione tra il VLA-4, espresso dalle CSL, e la fibronectina, espressa dalle cellule dello stroma, sia responsabile dell'aumentata forza di adesività delle CSL allo stroma midollare e quindi della possibile persistenza di malattia minima residua. Invece, la minore forza di adesione al VCAM-1 presentato dalle cellule stromali fa aumentare la quota di linfoblasti presenti nel sangue periferico e quindi fa sì che la popolazione leucemica sia più facilmente aggredibile dalla chemioterapia con citosina arabinoside ed etoposide. Tra le molecole di adesione, il CD44 ha un ruolo sicuramente fondamentale per l'accasamento delle CSL e talaltro consente alla CSL di mantenere la propria immaturità differenziativi ("primitività"). Il CD44, necessario per le interazioni tra cellula e cellula e tra cellula e proteine della matrice extramidollare, si lega al proprio recettore, l'acido ialuronico, glicosamminoglicano espresso dai sinusoidi del midollo osseo e dalle regioni endosteali. Anche l'osteopontina, la fibronectina, e la selettina mediano l'adesione della CSL allo stroma, ma i segnali inviati da queste molecole di adesione passano tutti attraverso il CD44. Quest'ultimo è quindi in grado di trasdurre segnali intracellulari diversi. Il ruolo cardine del CD44 è ancor più sottolineato dal fatto che se i topi NOD/SCID che hanno ricevuto un trapiantato di cellule leucemiche umane sono trattati con l'anticorpo monoclonale H90 (anti-CD44) presentano una riduzione della massa leucemica perché la CSL non è più in gradi di accasarsi nella nicchia.

Però le integrine non controllano solo i processi di adesione cellulare, ma causano anche l'attivazione di segnali anti-apoptotici necessari alla sopravvivenza della

popolazione leucemica. In particolare, la kinasi integrina dipendente (ILK) si lega alla β -integrina e fosforila Akt attraverso la via di segnale presieduta dalla fosfatidil-inositolo-3-kinasi (PI3K). Il contatto diretto tra cellule leucemiche e cellule stromali induce l'attivazione di ILK/Akt/GSK3 β (glucosio sintetasi kinasi 3) che attraverso l'attivazione della via di segnale presieduta da NOTCH1, la fosforilazione di STAT3 ("signal transducer and activator of transcription 3"), la maggior produzione delle proteine Hes1 e Bcl-2 promuove la sopravvivenza della CSL. Gli inibitori di ILK e PI3K, LY294002 e QLT0267, bloccano l'attivazione di Akt, di GSK3 β e la produzione di Hes1 e Bcl-2. Da quanto riportato risulta che la via di segnale presieduta da ILK/Akt, essendo attivata sia nelle cellule leucemiche che in quelle stromali, potrebbe essere un ottimo bersaglio di terapia molecolare (Tabe et al, 2007).

Anche la deplezione di asparagina potrebbe costituire un importante obiettivo terapeutico. Infatti, le cellule mesenchimali stromali essendo dotate di alti livelli di asparagina sintetasi producono asparagina in grande quantità ed in tal modo impediscono alla terapia con asparaginasi di funzionare correttamente e di danneggiare le cellule di LA linfoblastica (LAL). Questo meccanismo funziona anche per le cellule staminali residenti nella nicchia che vengono così protette dalle cellule mesenchimali stromali (Iwamoto et al., 2007).

L'asse CXCR4/CXCL12

È stato osservato che le cellule di LAL-B e di LAM presentano alti livelli di CXCR4 significativamente correlati con una prognosi sfavorevole. Evidenze sperimentali indicano che le cellule leucemiche CXCR4 positive sono particolarmente sensibili al flusso di ione calcio, alla chemotassi, all'adesione ed alla migrazione mediate da CXCL12. Inoltre, gli xenotrapianti condotti nel topo NOD/SCID dimostrano che il CXCR4 è necessario per l'accasamento delle cellule di LAL-preB nel midollo osseo. Tutte queste evidenze sperimentali hanno costituito la base ed il razionale biologico per proporre l'impiego di inibitori di CXCR4 come terapia mirata a colpire la CSL nel suo microambiente. Studi preclinici hanno dimostrato AMD3100, un inibitore reversibile dell'asse CXCL12/CXCR4, blocca la chemotassi indotta da CXCL12, riduce la migrazione dei linfoblasti pre-B verso "layers" di cellule stromali, ed aumenta l'effetto antiproliferativo di vincristina e prednisone (Juarez et al., 2003). In un modello murino di LA promielocitica (LAP) è stato osservato che la contemporanea somministrazione di AMD3100 e chemioterapia si correlava ad un significativo aumento di cellule leucemiche nel sangue periferico (Nervi et al., 2009). Queste ultime erano quindi più facilmente aggredibili dalla chemioterapia ed era questo il meccanismo che spiegava la drastica riduzione della massa leucemica e la più lunga sopravvivenza osservata nei topi trattati con questo approccio sperimentale. Un altro studio sperimentale aveva indicato che le cellule leucemiche esposte ad un inibitore della chemotassi indotta da CXCL12 non erano più protette dalle cellule stromali e mostravano vie di segnale anti-apoptotiche non più funzionanti.

Un significativo aumento dei livelli di espressione di CXCR4 si osserva nelle LAM che presentano come difetto molecolare una "internal tandem dupli-

cation” (ITD) di Flt3 (Rombouts et al., 2004). Questa osservazione insieme a quelle fornite da vari studi preclinici indica che Flt3 partecipa alla mobilità delle cellule leucemiche mediata da CXCR4. Un recente studio ha dimostrato che nelle colture di blasti leucemici e di cellule stromali l’inibizione di CXCR4 rende le cellule con l’ITD di Flt3 sensibili all’azione apoptotica del sorafenib, un inibitore di Flt3. Inoltre, nei topi sottoposti a xenotrapianto di cellule leucemiche umane positive per l’ITD di Flt3, la somministrazione di AMD3100 associata o meno a fattore di crescita determinava la mobilitazione delle cellule leucemiche e dei progenitori ematopoietici nel sangue periferico e la somministrazione di sorafenib induceva l’allungamento della sopravvivenza (Zeng et al., 2009). Pertanto, la somministrazione di AMD3100 impediva al microambiente midollare ed alla cellula stromale in particolare di svolgere un’azione protettiva nei confronti della CSL. Nella leucemia mieloide cronica (LMC), invece, i blasti leucemici esprimono bassi livelli di CXCR4 e mostrano una scarsa migrazione in risposta a CXCL12. È la terapia con imatinib e con alfa interferone a far aumentare l’espressione di CXCR4 e a far sì che nelle colture combinate di cellule leucemiche e di cellule stromali si verifichi una maggior migrazione delle cellule leucemiche verso le cellule stromali con acquisizione di chemioresistenza. L’importanza dell’asse CXCL12/CXCR4 per l’accasamento della CSE e della CSL è stata recentemente sottolineata da un altro studio sperimentale. Quest’ultimo ha dimostrato che le cellule leucemiche trapiantate nel topo inizialmente migrano verso la nicchia ematopoietica vascolare CXCL12 positiva. Dopo un mese però la produzione di CXCL12 nella nicchia vascolare si riduceva significativamente e se questi topi venivano nuovamente trapiantati con cellule staminali normali CD34 positive queste migravano verso nicchie tumorali con un meccanismo indipendente dall’espressione di CXCL12 ma dipendente dai livelli di “stem cell factor” abbondantemente secreto dai blasti leucemici (Colmone et al., 2008). Questa osservazione indica che la CSL può by-passare e alterare i meccanismi di “signaling” della nicchia ematopoietica fisiologicamente utilizzati dalla CSE normale per il proprio accasamento. Da quanto esposto risulta quindi che gli inibitori di CXCR4 potrebbero, grazie alla loro capacità di mobilitare le cellule leucemiche nel sangue periferico, essere molto utili nell’impedire al microambiente di svolgere un’azione protettiva nei confronti della CSL ma potrebbero altresì danneggiare i progenitori ematopoietici normali specie quando vengano impiegati insieme alla chemioterapia. Questa tossicità potrebbe essere però evitata da una terapia cellulare specificamente mirata alla cellula leucemica. Tale terapia potrebbe associare ad esempio un anticorpo monoclonale o un inibitore di una kinasi con un antagonista di CXCR4. Invece, un inibitore dello “stem cell factor” potrebbe essere utile per bloccare l’interazione dei progenitori ematopoietici sani con le nicchie tumorali e quindi per garantire una certa quota di ematopoiesi normale durante il decorso clinico di varie neoplasie ematologiche.

Ipossia e aumentata espressione di VEGF

L’ipossia tramite il fattore trascrizionale 1 alfa ipossia inducibile (HIF-1 α) stimola la neo-angiogenesi. Osservazioni recenti indicano che le cellule leucemiche

sono capaci di proliferare in condizioni di ipossia e che un' aumentata espressione di HIF-1 α si osserva a livello dei clusters di cellule leucemiche presenti nel midollo osseo (Fiegl et al, 2009). È importante segnalare che HIF-1 α regola l'espressione di CXCL12 sulla superficie delle cellule endoteliali e che l'ischemia miocardica fa aumentare i livelli di CXCL12 tanto più quanto più bassa è la tensione di ossigeno. Anche nelle LAM l'espressione di CXCR4 da parte delle cellule leucemiche aumenta in condizioni di ipossia sia *in vivo* che *in vitro*. Questa osservazione suggerisce che l'espressione di CXCR4 sia controllata da HIF-1 α . È quindi facilmente comprensibile come un microambiente midollare ipossico che esprime alti livelli CXCL12, fattore necessario per la mobilizzazione, e di CXCR4, suo specifico recettore, possa essere il centro di reclutamento e di trattenimento di eventuali progenitori leucemici (Lee et al., 2009). Pertanto, la molecola HIF-1 α potrebbe essere un ottimo bersaglio terapeutico come è stato recentemente ribadito da uno studio che ha dimostrato che le antracicline, doxorubicina e daunorubicina, sono potenti inibitori di HIF-1 α . Inoltre, uno studio clinico di fase I tuttora in corso che ha analizzato gli effetti di PX-478, un inibitore diretto di HIF-1 α , ha dimostrato che tale molecola possiede un'attività antitumorale in molti modelli di xenotrapianto.

Un'altro effetto dell'ipossia midollare mediato da HIF-1 α è rappresentato dall'aumentata espressione di VEGF che fa aumentare la formazione di piccoli vasi nel microambiente midollare. Il VEGF prodotto dalle cellule leucemiche si lega a recettori specifici presenti sia sulle cellule leucemiche che sulle cellule endoteliali e ne stimola la proliferazione. Inoltre nelle LAM il VEGF blocca l'apoptosi indotta dall'etoposide e dalla doxorubicina perché fa aumentare l'espressione di MCL-1, una molecola ad azione anti-apoptotica appartenente alla famiglia di BCL-2.

Bibliografia

1. McCulloch EA. Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982). *Blood*. 1983; 62: 1-13.
2. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994; 367: 645-648.
3. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukaemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997; 3: 730-737.
4. Lane WL, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009; 114: 1150-1157.
5. Jordan CT. The leukemic stem cell. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007; 20: 13-18.
6. Harada Y, Harada H. Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. *Cellular Physiol*. 2009; 220: 16-20.
7. Bernasconi P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute

- myeloid leukemia: Relationships and distinctions- a review. *Brit J Haematol.* 2008; 142: 695-708.
8. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT, Christiansen DH. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2008; 22: 240-248.
 9. Kristov A, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA. Transformation from committed progenitors to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature.* 2006; 442: 818-822.
 10. Deguchi K, Gilliland DG. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia.* 2002; 16: 740-744.
 11. Ayala F, Dewar R, Kalluri R. Contribution of bone marrow microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia.* 2010; 23: 2233-2241.
 12. Wei J, Wunderlich M, Fox C, et al. Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell.* 2008; 13: 483-495.
 13. Lord BI, Testa NG, Hendry JH. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood.* 1975; 46: 65-72.
 14. Adams GB, Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nature Immunol.* 2006; 7: 333-337.
 15. Perry JM, Li L. Disrupting the stem cell niche: good seeds in bad soil. *Cell.* 2007; 129: 1045-1047.
 16. Xie Y, Yin T, Wiegraebe T, et al. Detection of functional hematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature.* 2009; 547: 97-101.
 17. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008; 132: 598-611.
 18. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005; 121: 1009-1121.
 19. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a bone marrow microenvironment. *Cell.* 2007; 131: 324-336.
 20. Calvi LM, Adams GB, Weilbrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the hematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003; 425: 841-846.
 21. Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, et al. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic receptor gamma deficiency. *Cell.* 2007; 129: 1097-1110.
 22. Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, et al. Pten dependence distinguishes hematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature.* 2006; 441: 475-482.
 23. Rupec RA, Jundt F, Rebholz B, et al. Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I kappa B alpha. *Immunity.* 2005; 22: 479-491.
 24. Matsuoka S, Oike Y, Onoyama I, et al. Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev.* 2008; 22: 986-991.

25. Tabe Y, Jin L, Tsutsumi-Ishii Y, et al. Axctivation of integrin-linked kinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 684-694.
26. Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, et al. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest* 2007; 117: 1049-1057.
27. Juarez J, Bradstock KF, Gottlieb DJ, et al. Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblòastic cell in vitro. *Leukemia.* 2003; 17: 1294-1300.
28. Nervi B, Ramirez P, Retting RP, et al. Chemosensitization of AML following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood.* 2009; 113: 6206-6214.
29. Rombouts EJ, Pavic B, Löwenberg B, et al. Relation between CXCR4 expression, Flt3 mutations and unfavourable prognosis od adult acute myeloid leukaemia. *Blood.* 2004; 104: 550-557.
30. Zeng Z, Shi YX, Samudio IJ, et al. Targeting the leukaemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood.* 2009; 113: 6215-6224.
31. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, et al. Leukemic cells create bone marrow nichel that disrupt the behaviour of normal hematopoietic progenitor cells. *Science.* 2008; 322: 1861-1865.
32. Fiegl M, Samudio I, Clise-Dwyer K, et al. CXCR4 expression and biological activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure. *Blood.* 2009; 113: 1504-1512.
33. Lee K, Qian DZ, Rey S, et al. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 2353-2358.

Cellule staminali leucemiche dormienti nella patogenesi della LMC: può il CXCR4 essere un bersaglio per la eradicazione della malattia?

Giuliana Alimena

Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Sezione di Ematologia,
Università "La Sapienza", Roma

La leucemia mieloide cronica (LMC) è una malattia mieloproliferativa di origine clonale, caratterizzata dalla traslocazione del gene ABL, localizzato sul cromosoma 9q34, sulla regione genica BCR del cromosoma 22q11 (t(9;22)(q34;q11), cromosoma Ph), con formazione di un gene ibrido BCR/ABL codificante per una proteina ad aumentata attività tirosino-chinasica (TK). La conseguenza fisiopatologica di tale riarrangiamento è una trasformazione ematopoietica che si estrinseca con una crescita cellulare indipendente dai fattori di stimolo, una aumentata proliferazione, una ridotta apoptosi, una alterata adesione delle cellule al microambiente con conseguente anomala immissione in circolo di precursori granulocitari, e una instabilità genetica responsabile della progressiva acquisizione di alterazioni geniche, causa di evoluzione acuta della malattia (1-3).

Per molti anni la terapia della LMC, basata su chemioterapici, ha controllato solo fenotipicamente la malattia, senza eliminare le cellule leucemiche, con una mediana di sopravvivenza di circa 48 mesi. La introduzione dell'Interferon negli anni '80 ha per la prima volta dimostrato la possibilità, anche se in un numero limitato di pazienti (10-15%), di ottenere una remissione citogenetica (RCC, 0% di cellule Ph+) e di associarsi ad un prolungamento della sopravvivenza (65-70 mesi) (4).

La sola terapia dimostratasi capace di eradicare la malattia in una consistente porzione di pazienti LMC è comunque rimasto per lungo tempo il trapianto allogenico di cellule staminali (TCS), seppur gravato da elevati rischi di morbilità-mortalità (5).

Dalla fine degli anni '90, la introduzione di agenti aventi come bersaglio la proteina BCR/ABL (inibitori delle TK, ITK), e capaci di bloccare il legame della proteina anomala con l'ATP e, quindi, la cascata di segnali che si innescano a valle, ha modificato sostanzialmente la prognosi e la storia clinica globale dei pazienti con LMC, essendo oggi la sopravvivenza proiettata a ca. 20 anni (6).

Così, con il trattamento attualmente considerato “standard” in prima linea, rappresentato dall’ITK Imatinib (STI571, Glivec), la maggior parte dei pazienti (>80%) in fase cronica ottiene una RCC, e oltre il 50% ottiene anche una risposta molecolare maggiore (RMM, riduzione del trascritto BCR/ABL >3 log rispetto ai valori di base, o ratio BCR/ABL su ABL pari a 0.1% secondo la Scala Internazionale (IS) standardizzata), che in una piccola percentuale di casi (ca 5-10%) raggiunge livelli non evidenziabili (RM completa, RMC) (6). Più profonde e più rapide risposte si ottengono con gli ITK di 2^a generazione, che oggi sono, però, registrati in seconda linea (in caso di resistenza e/o intolleranza all’imatinib) e utilizzati in 1^a linea solo nell’ambito di protocolli sperimentali (7, 8).

Tuttavia, nonostante gli ottimi risultati ottenuti con questi farmaci, una piccola percentuale di casi (10-15%) non risponde sin dall’inizio alla terapia (resistenza primaria) e circa 15-20% perde la risposta precedentemente ottenuta (resistenza secondaria). Il fenomeno della resistenza è considerato essere la conseguenza di meccanismi molteplici e complessi, spesso interagenti, che includono la “compliance” alla terapia, la biodisponibilità del farmaco, caratteristiche farmacocinetiche, alterazioni genetiche addizionali, mutazioni di BCR/ABL o combinazioni dei vari meccanismi. Schematicamente, il fenomeno della resistenza può essere

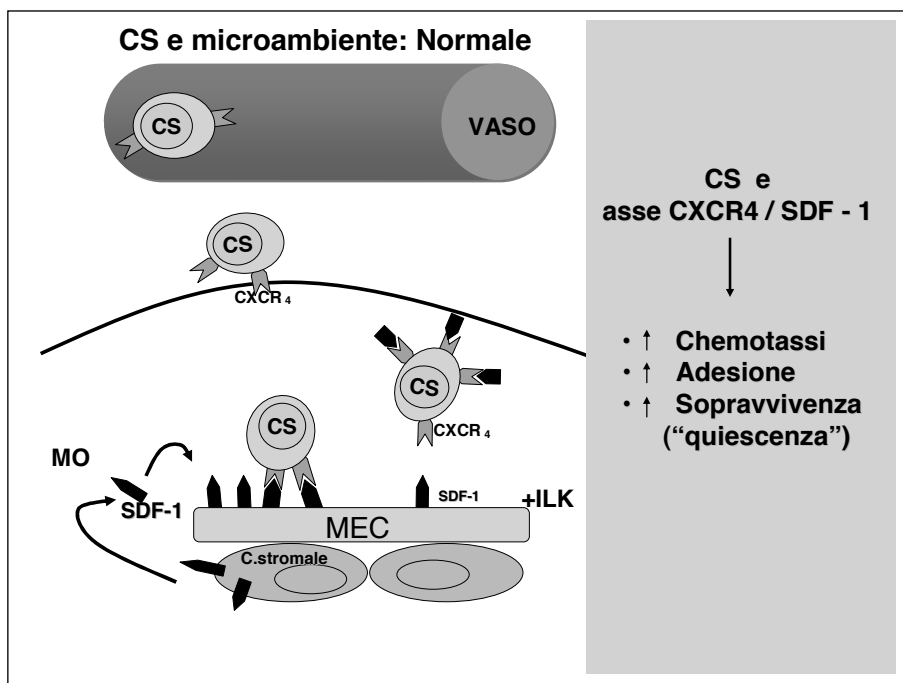


Fig 1 - Il recettore CXCR4, espresso sulla membrana delle cellule staminali (CS) normali, attraverso il legame con il fattore stromale SDF-1, media la chemotassi delle CS CD34+, e gioca un ruolo critico nell’“homing” e nella adesione di queste cellule al microambiente midollare, ricco in citochine (ILK) e altre molecole che favoriscono l’adesione. Le interazioni che di conseguenza le CS contraggono con quest’ultimo sono fondamentali per la loro maturazione, crescita e sopravvivenza.

suddiviso in BCR/ABL dipendente, dovuto ad amplificazione/iperespressione di BCR/ABL o a mutazioni nel dominio chinasi del gene, o in BCR/ABL indipendente, dovuto ad evoluzione clonale, a caratteristiche farmacocinetiche o, anche, ai rapporti che le cellule leucemiche contraggono con il microambiente (9). Come conseguenza, questi fenomeni si estrinsecano con una persistenza di cellule staminali leucemiche (CSL) che possono essere all'origine sia di una mancata risposta che di una recidiva di malattia (10).

In ogni caso, molti dati sia preclinici che clinici, indicano che CSL quiescenti sopravvivono in presenza di imatinib (11), sono più resistenti a stimoli proapoptotici, indicando possibili meccanismi di protezione nei confronti dei farmaci ITK o di altri agenti (12), persistono anche nei pazienti con risposte citogenetiche e molecolari (anche con trascritto non evidenziabile) (13), sarebbero all'origine di ricadute di malattia dopo sospensione del farmaco in pazienti con risposte molecolari complete anche di lunga durata (14). In altri termini, è possibile che un piccolo numero di cellule leucemiche sopravviva nonostante lunghi periodi di trattamento con ITK. L'imatinib eliminerebbe, quindi, la massa leucemica proliferante, ma non sarebbe in grado di eliminare le cellule primitive "inizianti" la leucemia (LIC), che manterrebbero uno stato di sottostante malattia residua (MMR), fonte possibile di resistenza o ricaduta (15-18). E una simile resistenza delle cel-

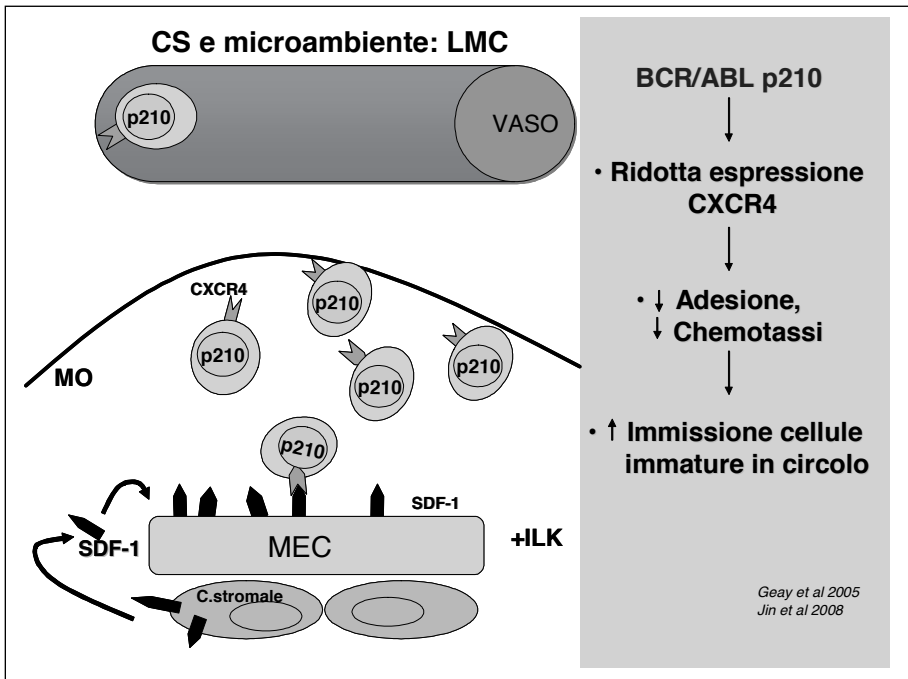


Fig. 2 - Nella LMC, per effetto della p210, si determinerebbe una ridotta espressione di CXCR4 con conseguente ridotta attività dell'asse CXCR4/SDF-1, responsabile di ridotta migrazione delle CS allo stroma midollare e aumentata liberazione/immissione in circolo delle stesse.

lule staminali quiescenti sarebbe stata evidenziata anche per i due inibitori di seconda generazione, nilotinib e dasatinib (19, 20).

È quindi ipotizzabile che associare gli ITK con altri agenti aventi bersagli differenti, oppure stimolare le cellule primitive quiescenti ad entrare in ciclo e divenire proliferanti, prima o durante il trattamento con ITK, potrebbe essere un modo per eliminare tali cellule (17, 21, 22). Per tale ragione, sono stati disegnati numerosi studi clinici sperimentali con lo scopo di “mirare” a queste CSL residue e tentare di eliminarle.

Sono state studiate o sono in corso di studio associazioni con inibitori delle farnesil transferasi (23), con immunoterapia con IFN o con vaccini specifici (24, 25), con inibitori della autofagia (26), con farmaci che antagonizzano antigeni iperespressi sulle cellule leucemiche, quali WT1, Pr3, PRAME (17), con attivatori di geni oncorepressori (27).

Basandosi sulla ipotesi che la proliferazione e la sopravvivenza delle CSL dipende almeno in parte dalle interazioni con il microambiente, è stato recentemente dimostrato in vitro (nella fattispecie la linea cellulare BV173) (28) che il blocco delle interazioni tra cellule LMC e stroma, attraverso la inibizione di recettori implicati nella adesione (ad es CXCR4), può aumentare la sensibilità delle cellule leucemiche agli ITK.

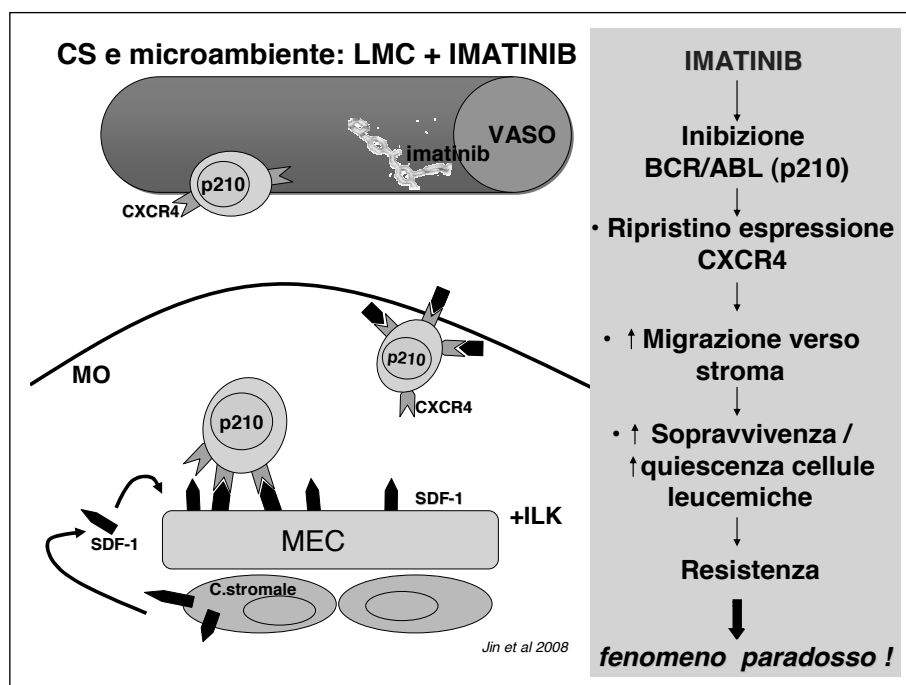


Fig. 3 - Nella LMC, la inibizione della p210 nelle CS CD34+ attraverso l'uso di ITK (imatinib), determinerebbe il ripristino della interazione CXCR4/SDF-1, con conseguente aumentata migrazione e adesione delle cellule allo stroma del microambiente midollare. Questo meccanismo faciliterebbe la sopravvivenza e la quiescenza delle stesse, rendendole meno accessibili, e quindi più resistenti, alla terapia (fenomeno paradossoso).

In particolare, il CXCR4, che è un recettore per il fattore stromale SDF1, nella LMC, per effetto dell'alterazione genica di BCR/ABL, è caratteristicamente "downregolato", e favorirebbe la migrazione cellulare dallo stroma al sistema vasale (Fig. 1).

Gli ITK, quali l'imatinib, restaurerebbero l'espressione di CXCR4, favorendo la adesione delle cellule staminali Ph+ allo stroma, proteggendole, in tale maniera, nelle "nicchie" midollari dalla azione dei farmaci, e conferendo resistenza alla apoptosi spontanea o indotta (29) (Fig. 2).

Pertanto, gli inibitori di CXCR4 (AMD3100, Plerixafor, inizialmente sviluppato per il trattamento della infezione HIV, in quanto inibitore dell'ingresso del virus nei linfociti T, e attualmente utilizzato come mobilizzatore di CS CD34+ a scopi trapiantologici), potrebbero avere la funzione di ridurre la adesione delle cellule staminali al microambiente ed il conseguente "effetto protettivo" esercitato dallo stesso, esponendole alla azione dei farmaci ITK (Fig. 3 e 4).

Inoltre, studi recenti in vitro e in vivo in modelli animali, hanno dimostrato la capacità degli inibitori di CXCR4 (Plerixafor) di mobilizzare cellule leucemiche di leucemia acuta, riducendone la sopravvivenza e sensibilizzandole all'effetto della chemioterapia o di inibitori di tirosin chinasi (anti Flt3) (30, 31); attualmente, sono in corso anche trials clinici sperimentali di fase I-II in pazienti con leucemia acuta mieloide resistenti o in recidiva, che hanno evidenziato le capaci-

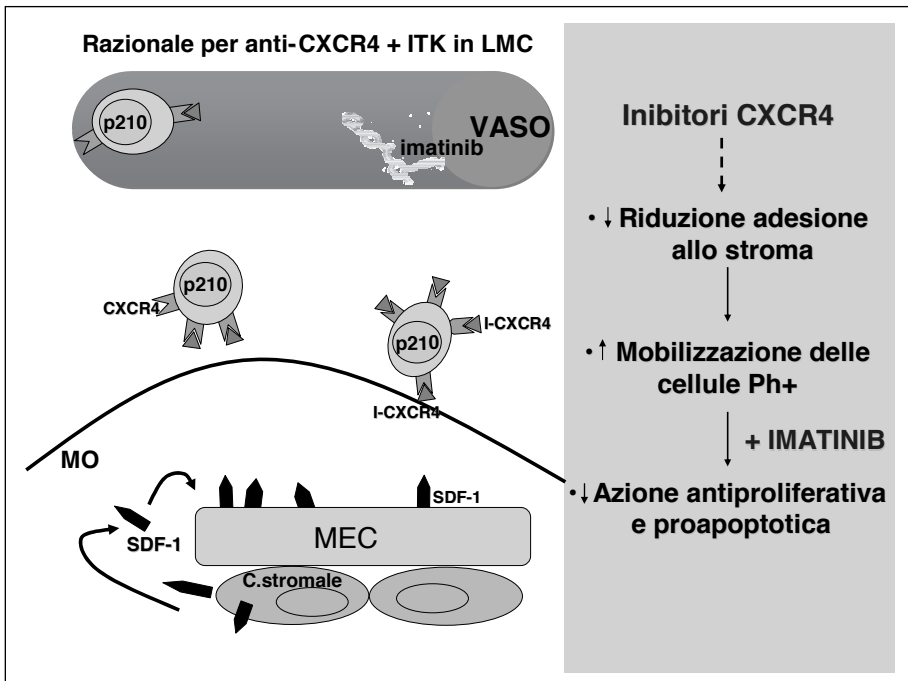


Fig. 4 - La inibizione farmacologica della attività di CXCR4 (I-CXCR4), combinata con l'uso di ITK, potrebbe rappresentare un razionale valido per interferire con l'effetto protettivo dello stroma e/o con i suoi segnali, rendendo le cellule più accessibili alla azione dei farmaci e facilitando così l'eradicazione delle cellule che rappresentano una sorgente potenziale di resistenza e/o recidiva.

tà di questi farmaci inibitori di CXCR4 (Plerixafor) di indurre mobilitazione delle cellule leucemiche, rendendole più sensibili all'effetto dei farmaci, senza che sia stata evidenziata una preferenziale mobilitazione delle cellule normali rispetto a quelle patologiche (32).

Gli studi effettuati in vitro nella LMC potrebbero facilmente essere applicati in trials clinici e, se le evidenze sopra descritte fossero confermate, queste metodiche potrebbero rappresentare un importante passo nella ricerca di eradicazione della LMC.

Restano comunque da chiarire in maniera più definita i meccanismi biologici degli inibitori di CXCR4, gli effetti delle associazioni farmacologiche in vivo, gli effetti sulle cellule normali, le conseguenze della mobilitazione delle CSL e, infine, le modalità della loro utilizzazione in protocolli terapeutici sperimentali.

Bibliografia

1. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 340: 1330-40.
2. Holyoake DT. Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukaemia: lessons to be learned from the laboratory. *Br J Haematol.* 2001; 113: 11-23.
3. Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl-positive chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2009; 113: 1619-1630.
4. Group CMLTC. Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: A meta analysis of seven randomized trials: *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89: 1616-1620.
5. Goldman JM. Treatment strategies for CML. *Best Practice & Research Clinical Hematology.* 2009; 22: 303-313.
6. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2009; 23: 1054-1061.
7. Rosti G, Palandri F, Castagnetti F, et al. Nilotinib for the frontline treatment of Ph+ chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2009; 114: 4933-4938.
8. Cortes JE, Jones D, O'Brien S, et al. Nilotinib as frontline treatment for patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase. *J Clin Oncol.* 2010; 3: 392-397.
9. Hochhaus A, La Roseé P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia.* 2004; 18: 1321-1331.
10. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control.* 2009; 16: 122-131.
11. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood.* 2002; 99: 319-325.
12. Holtz MS, Forman SJ, Bathia R. Non proliferating CML CD34+ progenitors are resistant to apoptosis induced by a wide range of proapoptotic stimuli. *Leukemia.* 2005; 19: 1034-1041.

13. Su Chu, Allen L, McDonald T, et al. Persistence of leukemia in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission on imatinib treatment for 5 years. *Blood*. 2008.
14. Rousselot P, Huguet F, Rea D, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood*. 2007; 109: 58-60.
15. Michor F, Hughes TP, Iwasa Y, et al. Dynamics of chronic myeloid leukemia. *Nature*. 2005; 435: 1267-1270.
16. Konig H, Holtz M, Modi H, et al. Enhanced BCR-ABL kinase inhibition does not result in increased inhibition of downstream signalling pathways or increased growth suppression in CML progenitors. *Leukemia*. 2008; 22: 748-755.
17. Goldman JM, Green AR, Holyoake TL, et al. Chronic myeloproliferative diseases with and without the Ph chromosome: some unresolved problems. *Leukemia*. 2009; 1-8.
18. Oravec-Wilson K, Philips ST, Yilmaz OH, et al. Persistence of leukemia-initiating cells in a conditional knockin model of an imatinib-responsive myeloproliferative disorder. *Cancer Cell*. 2009; 16: 137-148.
19. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, et al. Dasatinib (BMN-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*. 2006; 107: 4532-4539.
20. Jorgensen HG, Allan EK, Jordanides NE, et al. Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood*. 2007; 109: 4016-4019.
21. Jorgensen HG, Copland M, Allan EK, et al. Intermittent exposure of primitive quiescent chronic myeloid leukaemia cells to granulocyte-colony-stimulating factor in vitro promotes their elimination by imatinib mesylate. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 626-633.
22. Holtz MS, Forman SJ, Bhatia R. Growth factor stimulation reduces residual quiescent chronic myelogenous leukemia progenitors remaining after imatinib treatment. *Cancer Res* 2007; 67: 1113-1120.
23. Copland M, Pellicano F, Richmond L, et al. BMS-214662 potently induces apoptosis of chronic myeloid leukemia stem cells and synergises with tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2007; 111: 843-853.
24. Copland M, Fraser AR, Harrison SJ, et al. Targeting the silent minority: emerging immunotherapeutic strategies for eradication of malignant stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2005; 54: 297-306.
25. Bocchia M, Delfina M, Ippoliti M, et al. BCR-ABL derived peptide vaccine in chronic myeloid leukemia patients with molecular minimal residual disease during imatinib: interim analysis of a phase 2 multicenter GIMEMA CML Working Party Trial. *Blood*. 2009; 113: 648 (abstr).
26. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia positive cells including primary CML stem cells. *J Clin Invest*. 2009; 119: 1109-1123.

27. Neviani P, Santhanam R, Oaks JJ, et al. FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2408-2421.
28. Dillmann F, Veldwijk, Laufs S, et al. Plerixafor inhibits chemotaxis toward SDF-1 and CXCR4-mediated stroma contact in a dose-dependent manner resulting in increased susceptibility of BCR-ABL+ cell to Imatinib and Nilotinib. *Leukemia & Lymphoma.* 2009; 1-11.
29. Jin L, Tabe Y, Konoplev S, et al. CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7: 48-58.
30. Nervi B, Link DC, Di Persio JF. Cytokines and hemopoietic stem cell mobilization. *J Cellular Biochemistry.* 2006; 99: 690-705.
31. Zeng Z, Shi XY, Samudio IJ, et al. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood.* 2009; 113: 6215-6224
32. Uy GL, Retting MP, Cashen AF. Plerixafor, a CXCR4 antagonist for the mobilization of hematopoietic stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2008; 8: 1797-1804.

La cellula di origine della LLC-B e il supporto del microambiente

Marco Gobbi, Marino Clavio

Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche (DIMI), Università di Genova

Per molto tempo la leucemia linfatica cronica B (LLC) è stata considerata una sindrome linfoproliferativa cronica legata a progressivo accumulo di elementi linfociti immunoincompetenti, dovuto a inefficacia dei meccanismi apoptotici. Negli ultimi dieci anni un rinnovato interesse dei ricercatori per questa “noiosa” malattia ha portato ad un’esplosione di studi biologici, immunologici, citogenetici, molecolari e clinici. Ciò ha determinato un’autentica rivoluzione nel nostro modo di comprendere questa malattia (1, 2), che è riassunta nella seguente Tabella 1.

Da un punto di vista clinico l’utilizzo di nuovi marcatori prognostici (mutazioni somatiche dei segmenti genici VDJ, CD38, ZAP70, citogenetica) ha permesso di individuare forme cliniche realmente indolenti, con sopravvivenze misurabili in molti anni, spesso senza necessità di terapie e forme invece più aggressive, che richiedono terapia in tempi rapidi (3, 4). Questa evidente differenza clinica fra forme mutate e non mutate poggia su una reale diversità biologica? In altre parole sono ipotizzabili (almeno) due malattie diverse per cellula di origine e/o per interazioni cellulari e meccanismi di espansione clonale? Lo scopo di questo articolo è quello di sintetizzare la visione attuale su questi aspetti biologici ancora molto controversi.

Tab. 1 - LLC-B: inquadramento patogenetico ieri ed oggi.

	Ieri	Oggi
Omogeneità dei percorsi patogenetici	Malattia omogenea	Malattia disomogenea (almeno 2 forme)
Cellula di origine	Linfocito B immaturo (naive)	Linfocito B con esperienza di antigene
Competenza immunologica della cellula leucemica	Assente	Presente
Ruolo della stimolazione antigenica	Assente	Rilevante
Rinnovamento del clone leucemico	Minimo	Elevato
Principali meccanismi di crescita del clone	Accumulo da difettosa apoptosi	Segnali esterni di sopravvivenza (linfociti T e stroma) > proliferazione

Sviluppo del sistema linfoide B e cellula di origine dei linfomi

Lo studio fenotipico e molecolare del processo di differenziazione linfoide B ha permesso la creazione di uno schema generale all'interno del quale sono stati collocati i vari sottotipi di linfomi (5, 6). I linfociti B vergini (antigen unexperienced) di origine midollare possono incontrare gli antigeni con due modalità differenti. Possono farlo nelle zone T dipendenti del tessuto linfoide periferico e, con l'aiuto delle cellule T, di altre cellule e di citochine varie, cominciano a proliferare e a muovere verso i centri germinativi dei follicoli linfoidi secondari. Qui, sotto lo stimolo antigenico, la proliferazione linfoide si associa alla comparsa di mutazioni somatiche nei segmenti genici VDJ e VL. I linfociti che a seguito di queste mutazioni migliorano l'affinità per l'antigene vengono selezionati e sopravvivono mentre molti altri, divenuti meno affini, vanno incontro ad apoptosi. Molto spesso si verifica lo switch della classe anticorpale (da IgM a IgG o IgA). Usciti dal centro germinativo i linfociti B selezionati divengono plasmacellule o linfociti B memoria (che dimorano nella zona marginale della milza o del tessuto linfoide periferico).

In alternativa la stimolazione antigenica (soprattutto ad opera di polisaccaridi) avviene principalmente senza la cooperazione dei linfociti T, sempre nella zona marginale del tessuto linfoide periferico. In questo caso più difficilmente le cellule linfoidi vanno incontro a switch isotipico e le mutazioni somatiche dei segmenti VDJ e VL possono anche non comparire (7).

Quando negli anni '90 le cellule linfoidi dei vari sottotipi di linfomi B vennero

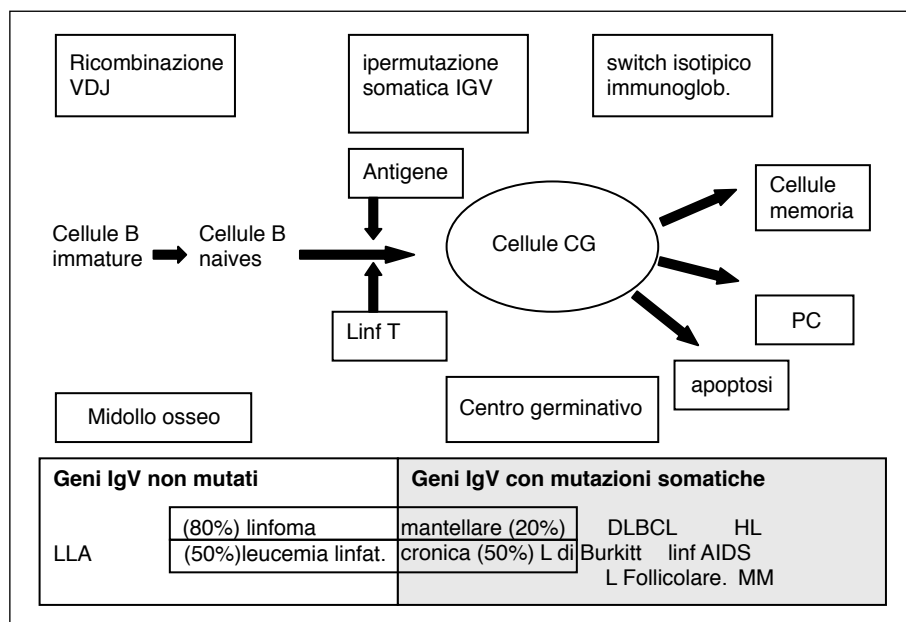


Fig. 1 - Sviluppo B linfoide e linfomagenesi (modificato da Klein U, EHA 2009).

analizzate per la presenza di mutazioni somatiche divenne evidente che la stragrande maggioranza dei linfomi (linfomi follicolari, Burkitt, DLBCL...) presentava mutazioni somatiche (8). La cellula di origine di questi linfomi doveva quindi essere o una cellula del centro germinativo che va attivamente incontro a ipermutazioni somatiche (ongoing mutations) o una cellula che aveva attraversato il microambiente del centro germinativo. Ciò non è affatto strano in quanto l'attraversamento del centro germinativo, proprio a causa del fenomeno delle ipermutazioni somatiche, espone le cellule linfoidi ad un rischio di mutazioni genomiche oncogenetiche (9, 10). Soltanto in pochi sottotipi linfomatosi le cellule linfoidi potevano in una parte dei casi non presentare mutazioni somatiche. Nell'80% dei linfomi mantellari (MCL) e nel 50% delle LLC il clone linfoide è composto da linfociti non mutati.

Nella figura 1 sono riportate schematicamente lo sviluppo fisiologico dei linfociti B e la correlazione con la linfomagenesi.

I linfociti della LLC (mutati e non mutati) sono cellule antigen-experienced

Le osservazioni sopra riportate inducevano quindi a pensare che i cloni delle LLC mutate derivassero da linfociti B con esperienza di antigene, data la correlazione causale fra stimolazione antigenica e comparsa di mutazioni somatiche. Era possibile pensare invece che nelle forme non mutate la cellula di origine della LLC potesse essere un linfocita B naive, senza esperienza di antigene. In realtà una discreta mole di dati accumulatasi negli ultimi anni sembra indicare che tutte le cellule della LLC (quelle mutate e quelle non mutate) hanno incontrato l'antigene e che in tutti i casi la stimolazione antigenica svolge un ruolo patogenetico rilevante (11).

Intanto le cellule CLL hanno spesso un fenotipo "attivato", con presenza di CD38 e di CD79b down regolato, con presenza di varianti di splicing tipiche delle cellule attivate (12). Poi, sia nelle forme mutate sia in quelle non mutate, si osserva un utilizzo preferenziale di alcuni geni della parte variabile delle Ig (IgHV 1-69), anche in pazienti con provenienza geografica molto diversa (13, 14). Vi è dunque un repertorio molto selezionato rispetto alle cellule B normali. In particolare nelle forme non-mutate più del 20% dei casi utilizza un recettore B (BCR) stereotipato, cioè derivante dall'utilizzo degli stessi segmenti VDJ e VL. Ciò significa probabilmente che la stimolazione di uno stesso antigene ha selezionato una possibile specificità fra miriadi di combinazioni possibili (15). La probabilità che due cloni neoplastici possano condividere casualmente la stessa specificità al BcR è infatti molto bassa.

La maggior parte dei BCR dei cloni non-mutati presenta reattività polispecifica, cioè gli anticorpi prodotti reagiscono contro diversi antigeni, inclusi autoantigeni. Sia nelle forme mutate sia in quelle non-mutate gli studi di gene expression profile (GEP) evidenziano signatures di espressione genica compatibili più con quelle di cellule B memoria che con quelle di cellule B vergini (11). Studi recenti sembrano identificare un certo numero di trascritti espressi in modo differente nei casi mutati e non mutati (11).

Comunque nei casi non mutati sono espressi alti livelli di mRNA di geni che risultano attivati a seguito della stimolazione del BCR (16). Inoltre la differenziazione prognostica fra casi non mutati e mutati non è assoluta. Ad esempio i casi con riarrangiamento VH 3-21 hanno una prognosi infausta indipendentemente dalla presenza o meno di mutazioni somatiche ed il profile GEP li differenzia dai casi VH3-21 negativi (17). In conclusione le piccole differenze GEP fra forme mutate e non mutate e fra casi VH3-21 positivi e negativi sembrano indicare la rilevanza patogenetica di un determinato stimolo antigenico sul BCR piuttosto che la stadio di sviluppo di un precursore cellulare.

Come è possibile rendere conto dal fatto che, sebbene tutte le cellule siano soggette a stimolazione antigenica attraverso il BCR, esistano sottotipi con prognosi differente? Molto potrebbe dipendere dal fatto che nelle forme non-mutate o in quelle mutate ma con riarrangiamento VH3-21 è possibile una stimolazione antigenica continua del clone che potrebbe spiegare la maggiore velocità di espansione del clone e, conseguentemente la maggiore aggressività clinica. Nelle forme mutate non VH3-21 positive la mancanza di una reattività polispecifica del BCR farebbe mancare al clone questo supporto alla crescita o, in alternativa, un'eccessiva stimolazione potrebbe far acquisire alle cellule linfoidi B uno stato "anergico" (18).

Con entrambe le ipotesi il clone linfoide avrebbe un accrescimento più lento e quindi il decorso clinico risulterebbe più benigno anche per minore possibilità di acquisire alterazioni genetiche aggiuntive.

LLC: una o due cellule di origine?

L'insieme delle informazioni immunofenotipiche, molecolari e di GEP hanno permesso di elaborare diversi modelli patogenetici che presentiamo in modo sintetico.

Singola cellula di origine

Il modello è supportato soprattutto dagli studi di GEP, che suggeriscono che tutti i casi di LLC derivino da un precursore cellulare comune (11). Il confronto con l'analisi GEP di linfociti B in varie fasi di sviluppo evidenzia che questo precursore comune potrebbe appartenere al subset delle cellule CD27+ CD5-, subset piuttosto disomogeneo comprendente cellule B memoria e cellule della zona marginale (11). Il fattore unificante è che si tratta comunque di cellule che hanno incontrato l'antigene. Il subset delle cellule CD27+ comprende fino al 40% delle cellule del sangue periferico; sono CD27+ le cellule della zona marginale del tessuto linfoide e quelle tonsillari sottoepiteliali. Si tratta di cellule per lo più mutate, IgG+ o IgM+, che rispondono rapidamente all'antigene differenziandosi in cellule capaci di secernere anticorpi (19). Le cellule CD27+ IgM rispondono in modo T indipendente.

È a livello di questa cellula che inizia il processo multistep di leucemogenesi. A questo proposito è molto interessante confrontare le anomalie citogenetiche della CLL con quelle presente in altri linfomi, come linfoma di Burkitt, FL, DLBCL.

In questi linfomi sono caratteristicamente presenti traslocazioni cromosomiche bilanciate, che giustappongono proto-oncogeni ai loci Ig (BCL-2, MYC, BCL6). Si tratta di anomalie citogenetiche che derivano da errori durante la ricombinazione VDJ, lo switch isotipico, le mutazioni somatiche (per lo più nel centro germinativo) (9). Nella LLC le alterazioni citogenetiche sono molto diverse (trisomia 12 o delezioni...) (20); questo indica che nella cellula di origine della CLL i processi di rimodellamento dei geni delle Ig non sono attivi. Compiono invece nella LLC alterazioni citogenetiche che derivano dalla stimolazione antigenica del clone LLC. Esistono somiglianze con la hairy cell leucemia, che potrebbe condividere avere la stessa cellula di origine CD27+ (21). Anche in questa malattia linfoproliferativa mancano traslocazioni citogenetiche. Secondo questo modello l'espressione del CD5 sarebbe una conseguenza dell'attivazione delle cellule.

Secondo un altro modello la cellula di origine della LLC potrebbe appartenere ad un subset CD5+ presente a bassa frequenza. È stata recentemente identificata una popolazione tonsillare di cellule CD5+ che potrebbe rappresentare la controparte normale della LLC (22). Recentemente è stata evidenziata la presenza di cloni benigni CD5+ (MBL) ma la relazione causale con la CLL è ancora non chiarita. Riassumendo all'origine dell'espansione clonale vi è una stimolazione antigenica di un precursore comune (CD27+? CD5+?). Sono possibili poi due possibilità: se c'è cooperazione T cellulare questi precursori transitano attraverso il CG e acquisiscono mutazioni somatiche e switch isotipico. È molto probabile che le

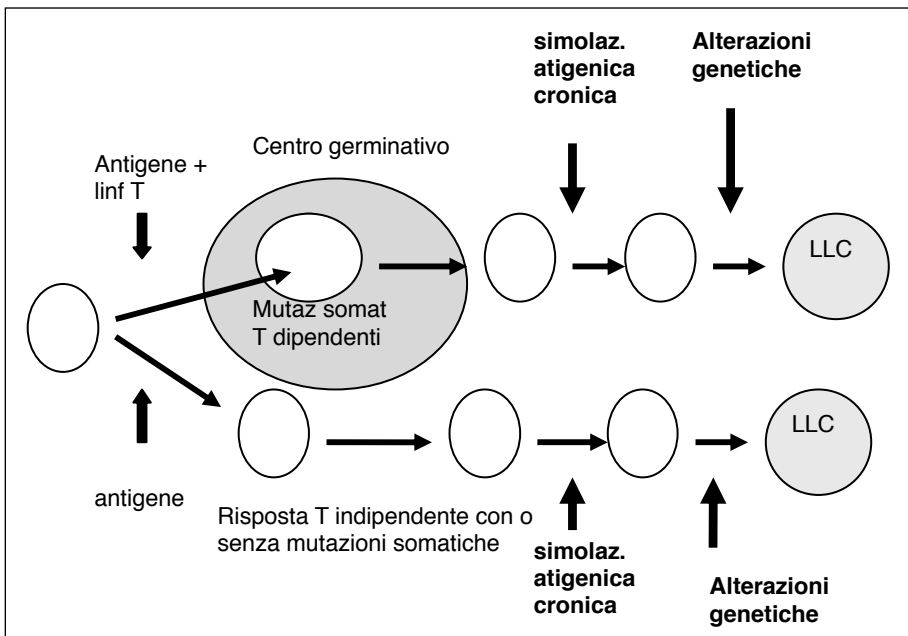


Fig. 2 - Modello di derivazione della LLC (modificato da Klein U EHA 2009).

mutazioni somatiche compaiano prima della trasformazione neoplastica. Se invece non c'è cooperazione T cellulare non si transita dal centro germinativo e le mutazioni somatiche possono essere o non essere presenti. Il differente destino delle cellule linfoidi dopo stimolazione antigenica potrebbe dipendere dal tipo di antigene o da differenti subsets di cellule della zona marginale (subset fisiologici ancora poco conosciuti al momento attuale). Molto dobbia è una terza via che non prevede ruolo per le cellule T e per la stimolazione antigenica.

Le alterazioni citogenetiche si accumulano nelle fasi successive per stimolazione antigenica. Se non ci sono mutazioni somatiche è possibile una più intensa stimolazione antigenica, magari da autoantigeni e quindi la probabilità che compaiano alterazioni citogenetiche è maggiore. La Figura 2 rappresenta in modo semplificato le possibili vie patogenetiche.

Duplica origine cellulare

Per quanto concerne la LLC mutata la cellula di origine potrebbe essere una cellula memoria che è uscita dal centro germinativo e ha iniziato il processo di trasformazione leucemica. In alternativa potrebbe trattarsi di una cellula della zona marginale che, dopo la stimolazione antigenica, ha acquisito mutazioni somatiche e, successivamente, ha completato il processo di trasformazione. In entrambi i casi l'acquisizione delle mutazioni somatiche precede il processo di trasformazione neoplastica. È difficile scegliere fra queste due ipotesi in quanto abbiamo poche informazioni sul repertorio dei geni Ig V delle MZ B cells e delle cellule memoria, in confronto con le cellule LLC-B (23).

Per quanto concerne la LLC non mutata non sono stati ancora individuati popolazioni fisiologiche normali caratterizzate da un impiego stereotipato del BCR. È possibile distinguere pertanto una fase preleucemica caratterizzata da uno stimolo antigenico che induce l'espansione di un ristretto numero di cloni che, successivamente vanno incontro a trasformazione leucemica. Non è chiaro se lo stimolo antigenico abbia solo un effetto facilitante o anche inducente la trasformazione. Nel topo è stato evidenziato un subset di cellule B dotate di un repertorio genico ristretto, che rispondono in modo T indipendente a antigeni e autoantigeni, producono anticorpi dell'isotipo IgM con attività anticorpale naturale. Queste cellule sono definite cellule B1 e si ritrovano prevalentemente nella cavità peritoneale (24). Nell'uomo potrebbe esistere una classe linfocitaria B1 simile la cui espansione potrebbe essere facilitata da una stimolazione antigenica precedente. È anche possibile che le forme non mutate di LLC derivino da cellule B della zona marginale (25).

Espansione del clone LLC: rilevanza del microambiente

La LLC-B è una tipica malattia in cui le interazioni fra cellule neoplastiche, fattori ambientali e stroma sono decisive per spiegare l'espansione clonale e anche le difficoltà terapeutiche, soprattutto le scarse possibilità di eradicare la malattia. Come già ricordato la stimolazione antigenica attraverso il BCR riveste un ruolo

centrale ed è dimostrata dal frequente utilizzo di recettori stereotipati, maggiormente nelle forme non mutate (40%) che in quelle mutate (10%). Non è ancora ben chiaro la natura di tali antigeni; è comunque un dato di fatto che quasi tutte le cellule LLC producono anticorpi monoclonali polireattivi, che reagiscono contro un certo numero di (auto) antigeni, comprendenti proteine del citoscheletro, strutture contenenti fosfolipidi e lipoproteine a bassa densità. La stimolazione antigenica è verosimilmente rilevante non solo per preparare/innescare la trasformazione neoplastica ma anche per sostenerne l'espansione.

I piccoli linfociti della LLC rappresentano un compartimento di accumulazione (fenotipo CD5+, CD20+, CD23+, Ki67+, Bcl2+, Bcl6-, Survivin+, CD10) che scorre nel sangue periferico. Essi derivano probabilmente da un compartimento di proliferazione (fenotipo CD5+, CD20+, CD23+, Ki67-, Bcl2+, Bcl6-, survivin-, CD10-) che si trova all'interno dei cosiddetti centri di proliferazione pseudofollicolari. Questi sono costituiti prevalentemente da proliferanti e paraimmunoblasti e sono dispersi nei linfonodi e, meno frequentemente nel midollo osseo (26). In questi centri di proliferazione svolgono probabilmente un ruolo molto rilevante le cellule T (supporto a breve termine) e le cellule stromali, incluse le cellule accessorie (supporto a lungo termine). L'interazione fra cellule T ed elementi linfoidi avviene tramite sistema CD40 ligando/CD 40 ma l'esatto meccanismo attraverso il quale queste cellule esercitano un effetto "trofico" sul clone leucemico non è ancora chiarito. Non è neppure chiaro quale meccanismo (secrezione di citochine con richiamo di cellule accessorie?) determini la comparsa diffusa di questi centri proliferativi e quale sia la percentuale di cellule che vanno in apoptosi o che si riversano nel sangue periferico. Il microambiente rappresenta un obiettivo terapeutico piuttosto interessante tuttavia non ne conosciamo ancora abbastanza. Sarà probabilmente necessario sviluppare dei sistemi culturali in vitro che riproducano i microambienti linfonodali e midollari (verosimilmente diversi).

Le cellule LLC iperattivate dall'antigene sono per lo più in fase G0 early-G1 e la stimolazione non sembra in grado di indurre le cellule alla proliferazione (è possibile che esista un difetto nel sistema di traduzione intracellulare del BCR). Comunque, come già ricordato, la stimolazione antigenica potrebbe rappresentare solo un evento preparatorio e non l'evento decisivo trasformante. A questo proposito è possibile ipotizzare che le cosiddette MBL (27) rappresentino uno stadio preparatorio per lo sviluppo successivo della LLC (in modo simile alle MGUS per il MM).

Bibliografia

1. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005; 352: 804-815.
2. Ferrarini M, Chiorazzi N. Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol.* 2004; 41: 207-223.
3. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A,

- Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94: 1840-1847.
4. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94: 1848-1854.
 5. Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Braeuninger A, Rajewsky K, Küppers R. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev*. 1998; 162: 261-280.
 6. Stevenson F, Sahota S, Zhu D, Ottensmeier C, Chapman C, Oscier D, Hamblin T. Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev*. 1998; 162: 247-259.
 7. Klein U. *Hematology Education EHA 2009*; 3: 55-60.
 8. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 1999; 341: 1520-1529.
 9. Küppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 2001; 20: 5580-5594.
 10. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 22-33.
 11. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001; 194: 1625-1638.
 12. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, Sison CP, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*. 2002; 99: 4087-4093.
 13. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW Jr, Ferrarini M, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998; 102: 1515-1525.
 14. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, Ikematsu H, Allen SL, Kolitz J, Rai KR, Nardini M, Tramontano A, Ferrarini M, Chiorazzi N. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2004; 113 (7): 1008-1016.
 15. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, Foa R, Damle RN, Fais F, Messmer D, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2004; 200: 519-525.
 16. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L,

- Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001; 194: 1639-1647.
17. Fält S, Merup M, Tobin G, Thunberg U, Gahrton G, Rosenquist R, Wennborg A. Distinctive gene expression pattern in VH3-21 utilizing B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005; 106: 681-689.
 18. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Bousset V, Caligaris-Cappio F, Ghia P. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*. 2008; 112: 188-195.
 19. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*. 1998; 188: 1679-1689.
 20. Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med*. 1999; 77: 266-281.
 21. Basso K, Liso A, Tiacci E, Benedetti R, Pulsoni A, Foa R, Di Raimondo F, Ambrosetti A, Califano A, Klein U, Dalla Favera R, Falini B. Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors. *J Exp Med*. 2004; 199: 59-68.
 22. Dono M, Burgio VL, Colombo M, Sciacchitano S, Reverberi D, Tarantino V, Cutrona G, Chiorazzi N, Ferrarini M. CD5+ B cells with the features of sub-epithelial B cells found in human tonsils. *Eur J Immunol*. 2007; 37: 2138-2147.
 23. Ferrarini M. The continuous search for the cell of origin of chronic lymphocytic leucemia. *Hematology Meeting Reports* 2009; 3: 81-85.
 24. Hardy RR. B-1 B cell development. *J Immunol*. 2006; 177: 2749-2754.
 25. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 323-335.
 26. Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol*. 2008; 26: 4497-4503.
 27. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, Kwok M, Fenton JA, Plummer M, de Tute R, Owen RG, Richards SJ, Jack AS, Hillmen P. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008; 359: 575-583.

Alterazioni genetiche e interazioni con il microambiente nei linfomi maligni

Silvia Rasi, Silvia Franceschetti, Alessio Brusca, Valeria Spina, Riccardo Bruna, Paola Riccomagno, Lorenzo De Paoli, Davide Rossi, Gianluca Gaidano

Divisione di Ematologia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale & BRMA, Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Novara

La classificazione dei linfomi si è evoluta nel corso degli anni e da un approccio esclusivamente morfologico si è passati alla odierna classificazione WHO (World Health Organization), che identifica entità cliniche definite in base a criteri multidisciplinari, in grado di combinare dati clinici, morfologici, istologici, immunofenotipici e genetici. Tuttavia, anche nell'ambito delle categorie nosologiche dei linfomi non-Hodgkin identificate dalla classificazione WHO, vi è la presenza di un'estrema eterogeneità sia per quanto riguarda la risposta al trattamento somministrato sia per quanto riguarda la sopravvivenza dei pazienti. Deriva quindi la necessità di perseguire la ricerca di nuovi marcatori molecolari che consentano l'identificazione di sottogruppi di pazienti che possano beneficiare di approcci terapeutici differenziati. Ad oggi, nell'ambito dei linfomi non-Hodgkin, sono state identificate numerose alterazioni genetiche, che ne hanno permesso di chiarire e definire la patogenesi della malattia.

Classicamente, la patogenesi dei linfomi non-Hodgkin viene ricondotta ad un processo multifasico in cui l'insorgenza in una cellula di una particolare alterazione genetica predispone la cellula stessa all'insorgenza di altre alterazioni genetiche. Queste alterazioni sono per lo più rappresentate da lesioni molecolari che apportano danni a proto-oncogeni e geni onco-soppressori. Nell'ambito delle lesioni molecolari dei proto-oncogeni, il principale meccanismo di deregolazione è rappresentato dalla traslocazione cromosomica. Mediante questo meccanismo, il proto-oncogene può essere allontanato dalle proprie strutture regolatorie ed essere posto sotto nuovi elementi di controllo, che tipicamente ne determinano la deregolazione della espressione. Alternativamente, la traslocazione cromosomica può determinare la formazione di un "trascritto di fusione", derivante dalla fusione dei due geni coinvolti nella rottura cromosomica. I proto-oncogeni attivati dalla formazione di proteine di fusione generano proteine chimeriche che mostrano nuove proprietà biologiche in grado di sostenere il processo di linfomagenesi. Solitamente l'inattivazione bi-allelica di geni onco-soppressori avviene per mutazione inattivante di un allele e delezione dell'altro allele, secondo un processo multifasico. In una minoranza di casi invece, l'inattivazione bi-allelica è causata

da una doppia mutazione su entrambi gli alleli o è sostenuta da una delezione in omozigosi del gene. Un meccanismo di acquisizione di mutazioni tipico dei linfomi è caratterizzato dalla “ipermutazione somatica”, che fisiologicamente riguarda i geni delle immunoglobuline, ma può estendersi in maniera aberrante (ipermutazione somatica aberrante) anche ad altri geni. Inoltre, l’inattivazione dei geni onco-soppressori può avvenire anche mediante il meccanismo di metilazione delle regioni regolatorie del gene, che ne determinano una ridotta espressione. Negli ultimi anni, nell’ambito dei linfomi non-Hodgkin, sono state identificate svariate alterazioni genetiche, e quindi nuovi marcatori molecolari, principalmente nel linfoma diffuso a grandi cellule B, nel linfoma follicolare, e nel linfoma mantellare, mentre sono ancora in fase preliminare nell’ambito dei linfomi a cellule T.

La presenza delle sole lesioni molecolari può però non essere una condizione sufficiente a indurre l’insorgenza di linfomi e spiegarne quindi la patogenesi. Il microambiente è infatti un fattore avente un ruolo fondamentale nel promuovere la linfomagenesi, poiché induce e regola la proliferazione cellulare. L’importanza del microambiente nello sviluppo di linfomi è stato osservato principalmente nell’ambito del linfoma follicolare, ma si pensa che anche l’insorgenza di altri tipi di linfomi, quali il linfoma mantellare e il linfoma delle zone marginali, possa essere strettamente correlata al microambiente.

Linfoma diffuso a grandi cellule B

Il linfoma diffuso a grandi cellule B (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL) rappresenta approssimativamente il 40% dei linfomi non-Hodgkin diagnosticati nella popolazione adulta.

Un’alterazione frequente nell’ambito dei DLBCL è rappresentata dalle traslocazioni cromosomiche coinvolgenti la banda 3q27 e svariati siti cromosomici, tra cui il locus delle immunoglobuline. *BCL-6* è il proto-oncogene maggiormente coinvolto in queste traslocazioni cromosomiche ed è un repressore espresso selettivamente dalle cellule B del centro germinativo. Altre traslocazioni riguardano il gene *BCL-2* e *cMYC*, anch’essi posti sotto il controllo trascrizionale dei geni regolatori del locus delle immunoglobuline. Ulteriori meccanismi patogenetici descritti nel DLBCL includono la ipermutazione somatica aberrante di proto-oncogeni, incluso *BCL-6*, la delezione del “FAS death-domain” e mutazioni inattivanti di *p53*.

L’analisi dell’espressione genica mediante la metodica del “gene expression profiling” (GEP), ha consentito di postulare l’esistenza di sottotipi distinti nell’ambito dei DLBCL, caratterizzati da specifiche “molecular signatures”. I primi studi di GEP applicati al DLBCL hanno identificato due gruppi prognostici distinti caratterizzati da una istogenesi diversa: i DLBCL “germinal-center B-cell like” (GCB-DLBCL), che riflettono il GEP di cellule B del centro germinativo e presentano prognosi favorevole; e i DLBCL “activated B-cell like” (ABC-DLBCL), che invece riflettono il GEP di cellule B post-centro germinativo e presentano prognosi sfavorevole.

Altri studi di GEP hanno suddiviso i DLBCL secondo altri pannelli di espressione genica delineando tre gruppi distinti:

1. “oxidative phosphorylation (Ox Phos)”;
2. “B-cell receptor/proliferation (BCR)”;
3. “Host Response (HR)”.

Il primo gruppo presenta aumentati livelli di espressione di geni associati alla fosforilazione ossidativa, alla funzione mitocondriale, e al trasporto degli elettroni.

Si tratta principalmente di DLBCL caratterizzati da lesioni genetiche coinvolgenti i membri della famiglia di *BCL-2*. Il secondo gruppo, presenta invece un'aumentata espressione di geni coinvolti nel “signaling” del recettore delle cellule B, nella proliferazione e replicazione cellulare, nel riparo del DNA e coinvolge anche fattori di trascrizione specifici della cellula B, tra cui *BCL-6*. In ultimo, il sottogruppo HR presenta un'elevata espressione di geni associati ai pathways delle cellule T e geni correlati alla risposta immune/infiammatoria.

Linfoma follicolare

Il linfoma follicolare (Follicular Lymphoma, FL) rappresenta il 25-30% dei linfomi non-Hodgkin. Circa il 90% dei casi di FL è caratterizzato dalla attivazione del gene *BCL-2* che avviene tramite la traslocazione $t(14;18)(q32,q21)$ coinvolgente il locus di *BCL-2* ed il locus delle immunoglobuline. La traslocazione deregola l'espressione di *BCL-2* che viene pertanto espresso ad alti livelli proteggendo la cellula dalla morte cellulare programmata (apoptosi). Questo avviene poiché *BCL-2* è un gene che non regola direttamente la proliferazione cellulare bensì è preposto al controllo dell'apoptosi. La traslocazione di *BCL-2* fornisce alla cellula un vantaggio di sopravvivenza, ma non è di per sé sufficiente ad indurre la linfomagenesi.

Nell'ambito dei FL, mediante analisi GEP sono stati identificati due profili distinti associati a diversa prognosi. Le due “signatures” GEP identificate nel FL sono state definite “risposta immune tipo 1 (IR-1)” e “risposta immune tipo 2 (IR-2)”, poiché i geni coinvolti includono loci espressi differenzialmente dalle cellule del sistema immunitario normale. La “signature” IR-1 comprende geni per lo più espressi da cellule T tra cui *CD7*, *CD8B*, *ITK* e *LEF1*, e si associa a prognosi favorevole. La “signature” IR-2 comprende invece geni iperespressi da macrofagi e cellule dendritiche, tra cui *CD64*, *TLR5* e varie componenti del complemento, e si associa a prognosi sfavorevole. Questo sta quindi ad indicare un ruolo significativo del microambiente nello sviluppo e nella progressione tumorale. Il FL è infatti una neoplasia in cui diversi tipi cellulari sono organizzati in un microambiente complesso. Le proprietà del microambiente nel FL influenzano fortemente il quadro clinico della malattia, anche se l'esatta natura della popolazione cellulare del microambiente è ancora in parte sconosciuta. In diversi studi sono state indagate le caratteristiche cellulari del tumore, delle sottopopolazioni linfocitarie T, delle cellule dendritiche follicolari e dei macrofagi in associazione con l'outcome clinico, ma i dati pubblicati riguardanti il ruolo prognostico del microambiente sono ad oggi molto contrastanti.

Una frazione di FL progredisce a linfoma altamente aggressivo, che nella maggior parte dei casi è rappresentato da DLBCL. Questa trasformazione clinicopatologica si accompagna a mutazione di *p53* nel 90% dei casi, ma può anche presentare inattivazione dei geni oncosoppressori *p15* e *p16*, ipermutazione somatica aberrante di molteplici proto-oncogeni e, più raramente, attivazione di *c-MYC*.

Linfoma mantellare

Il linfoma mantellare (Mantle Cell Lymphoma, MCL) rappresenta approssimativamente il 3-10% dei linfomi non-Hodgkin. È caratterizzato dalla traslocazione t(11;14) coinvolgente il locus *BCL-1* (ciclina D1), un fattore di controllo del ciclo cellulare, ed il locus delle immunoglobuline. La traslocazione provoca una sovraespressione del proto-oncogene *BCL-1* che determina un'alterazione del ciclo cellulare e conseguente sviluppo tumorale.

Mediante analisi GEP è stato possibile identificare una "signature" propria dei pazienti con MCL, indipendentemente dalla iperespressione di ciclina D1. In particolare alcuni linfomi, pur essendo ciclina D1 negativi (<10% dei casi), esprimono la "signature" propria dei MCL. Tra questi vi sono geni che hanno un ruolo nella regolazione dell'apoptosi, nel controllo del ciclo cellulare e nella trasduzione del segnale. In particolare nei MCL sono stati riscontrati deregolati geni coinvolti nei pathways di TNF, NFκB, TGFβ, WNT e PI3K/AKT, mentre è stata osservata una correlazione tra la presenza del recettore di IL10 (IL10R) e una maggiore sopravvivenza dei pazienti. Infine, l'analisi GEP ha permesso il riconoscimento molecolare della variante blastoide di MCL, caratterizzata da iperespressione di cyclin-dependent kinase (CDK) 4 e di CDC28 protein kinase 1. CDK4 si associa con ciclina D1 e favorisce la progressione del ciclo cellulare attraverso il checkpoint G1/S. L'iperespressione di CDC28 protein kinase 1 blocca l'inibizione del complesso ciclina D1/CDK4 da parte dell'inibitore CDK p27/Kip1.

Linfomi a cellule T-periferiche

I linfomi a cellule T-periferiche (Peripheral T-cell Lymphoma, PTCL) costituiscono circa il 10-15% di tutti i linfomi non-Hodgkin. In circa il 50% dei casi si parla di PTCL non specificato (unspecified PTCL, PTCL-U), mentre gli altri casi sono suddivisi in linfoma T a grandi cellule anaplastiche (Anaplastic Large Cell Lymphoma, ALCL), linfoma T angio-immunoblastico (Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma, AILT), linfoma e leucemia T dell'adulto (adult T-cell leukemia and lymphoma, ATLL). Nei pazienti ALCL è tipica la traslocazione t(2;5) che determina la formazione di una proteina di fusione codificata dai geni *NPM* e *ALK*. *NPM* codifica per una proteina nucleolare, mentre *ALK* codifica per una tirosina chinasi normalmente espressa nelle cellule T. Vi sono poi altre anomalie citogenetiche ricorrenti, quali la trisomia del cromosoma 3, 5, 8 e X, le delezioni del 6q, i riarrangiamenti del 7q, la monosomia 13 o la delezione di 13q14.

Mediante analisi GEP sono stati identificati due sottogruppi di PTCL: un gruppo a prognosi favorevole, associato alla espressione dei geni della via di NFκB, e un

secondo gruppo a prognosi sfavorevole, associato ad una alta espressione di geni coinvolti in pathways correlati alla proliferazione cellulare. Da analisi GEP è stato anche identificato *PDGFRA* come gene potenzialmente coinvolto nella patogenesi dei PTCL. Infine, un ultimo studio ha caratterizzato tre sottogruppi prognostici di PTCL in base al profilo di espressione citochinica: cattiva prognosi in associazione all'espressione di CCR4, intermedia per l'espressione di CXCR3 e favorevole in associazione ad espressione di CCR3.

Mediante analisi GEP è stato osservato che AILT si associa tipicamente ad un "fenotipo Th1" caratterizzato dalla espressione di citochine quali CXCR3, TNF receptor OX40, e CXCL13. In particolare, quest'ultimo marcatore è uno tra i geni maggiormente espressi da parte delle cellule T regolatorie del centro germinativo (CG-Th), da qui l'ipotesi che l'istogenesi del AILT sia riconducibile a questo tipo cellulare. Gli ALCL sono invece associati ad un "fenotipo Th2" caratterizzato dall'espressione delle citochine CCR3 e CCR4, e dei geni IL13R, FOS e JUNB. Ad oggi però, l'analisi GEP nei linfomi T ha fornito solo risultati preliminari poiché effettuata su casistiche ridotte, e si tratta quindi di modelli che necessitano di ulteriore validazione.

Conclusioni e prospettive future

Numerosi esempi dimostrano come le alterazioni genetiche individuate nei linfomi maligni rappresentino importanti marcatori molecolari sia di diagnosi che di prognosi e siano strumenti validati e indispensabili nella pratica diagnostica. I marcatori molecolari hanno anche un ruolo indispensabile nella costruzione di modelli prognostici che possano consentire di adattare la terapia a ciascun paziente. Per una più completa caratterizzazione delle diverse classi di linfomi risulta quindi indispensabile ampliare le conoscenze riguardo le lesioni genetiche, anche mediante l'utilizzo di nuove tecnologie in particolare la metodica GEP.

Sebbene il meccanismo dettagliato mediante cui il microambiente possa causare l'insorgenza dei linfomi non sia stato ancora del tutto chiarito, è certo che anche questo meccanismo, oltre alla presenza di lesioni genetiche, abbia un ruolo fondamentale nella linfomagenesi. È indispensabile quindi cercare di comprendere maggiormente l'interazione tra linfoma e microambiente per una migliore comprensione dello sviluppo del linfoma stesso. Identificare il ruolo e le interazioni fra le diverse componenti cellulari presenti nei linfomi potrebbe permettere l'individuazione di nuovi target terapeutici per questo tipo di malattia.

Bibliografia

1. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000; 403: 503-511.
2. Buckstein R, Pennel N, Berinstein NL, et al. What is remission in follicular lymphoma, and what is its relevance? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005; 18: 27-56.

3. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003; 101: 78-84.
4. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2159-2169.
5. Gaidano G, Dalla-Favera R. Pathobiology of non-Hodgkin's lymphomas. In *Hematology. Basic Principles and Practice*, 4th edition. Hoffman R, Benz EJ, jr., Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein L, McGlave P, eds. Philadelphia: Elsevier, 2005; 1307-1324.
6. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004; 103: 275-282.
7. Hofmann WK, de Vos S, Tsukasaki K, et al. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood*. 2001; 98: 787-794.
8. Iqbal J, Liu Z, Deffenbacher K, Chan WC. Gene expression profiling in lymphoma diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009; 22: 191-210.
9. Leich E, Hartmann EM, Burek C, Ott G, Rosenwald A. Diagnostic and prognostic significance of gene expression profiling in lymphomas. *APMIS*. 2007; 115: 1135-46.
10. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 995-1007.
11. Martinez-Delgado B. Peripheral T-cell lymphoma gene expression profiles. *Hematol Oncol*. 2006; 24: 113-119.
12. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood*. 2005; 105: 1851-1861.
13. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood*. 2003; 101: 4279-4284.
14. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal-center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2007; 109: 4930-4935.
15. Piccaluga PP, Agostinelli C, Zinzani PL, Baccarani M, Dalla-Favera R, Pileri SA. Expression of platelet-derived growth factor receptor alpha in peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified. *Lancet Oncol*. 2005; 6: 440.
16. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002; 346: 1937-1947.
17. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, et al. Prognostic significance of bcl-6 expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood*. 2006; 107: 4207-4213.

Cellula staminale mielomatosa e microambiente midollare: rilevanza patogenetica nel MM

Antonino Neri, Luigia Lombardi

Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Milano, Ematologia 1,
CTMO Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

La plasmacellula del mieloma multiplo deriva da una cellula B del centro germinativo che è stata esposta a tre specifici meccanismi di modificazione del DNA che interessano in modo particolare il gene delle catene pesanti delle Ig (IGH): la ricombinazione delle regioni VDJ; la ricombinazione delle regioni switch; e le mutazioni ipersomatiche delle regioni variabili (1, 2). La ricombinazione VDJ avviene a livello dei precursori B nel midollo osseo e porta alla formazione del recettore specifico delle cellule B (BCR) mentre il riconoscimento e selezione antigenica, le mutazioni ipersomatiche e la ricombinazione delle regioni switch avvengono nel centro germinativo dei follicoli linfatici. In particolare, i linfociti B con immunoglobuline funzionali di superficie IgM (cellula B “naïve”) lasciano il midollo osseo ed entrano nei tessuti linfatici secondari dove successivamente all’incontro con l’antigene possono:

- 1) differenziare fuori dal centro germinativo in plasmacellule a breve vita “short-lived pre-germinal center plasma cells” che esprimono in massima parte IgM e non presentano ipermutazioni somatiche;
- 2) entrare nel centro germinativo dove vanno incontro a ipermutazione somatica e selezione antigenica.

Le cellule che non sviluppano una elevata affinità per l’antigene vanno incontro ad apoptosi mentre le rimanenti ritornano nel sangue periferico come cellule B della memoria oppure migrano nel midollo osseo dove interagiscono con le cellule del microambiente midollare e differenziano terminalmente in plasmacellule a lunga vita “long-lived post-germinal center plasma cells” che sopravvivono per 30 giorni o anche anni (3).

Come evidenziato da numerosi studi, le plasmacellule tumorali nel midollo sono per la maggior parte quiescenti similmente alla loro controparte normale costituita da cellule terminalmente differenziate che hanno perso la capacità di auto-mantenersi (4). Questi dati hanno suggerito pertanto che la crescita tumorale sia da attribuirsi ad una limitata sottopopolazione funzionalmente distinta. La prima

osservazione a questo riguardo risale ad una non recente pubblicazione che evidenziava come le cellule dal tumore plasmacellulare del topo Adj PC-5 siano clonogeniche *in vivo* ad una frequenza dell'1/1000-4000 cellule (5).

Successivamente questo è stato dimostrato *in vitro* sia nel tumore plasmacellulare murino che nel MM umano; in particolare, si è riscontrato che sebbene una larga parte (circa 85%) dei campioni tumorali da pazienti con MM siano in grado di formare colonie *in vitro*, questa proprietà è limitata solo ad una cellula su 100-100.000 (6). Si è pertanto ipotizzato che questa ristretta sottopopolazione di cellule mielomatose possa rappresentare il pool di cellule con caratteristiche di cancer stem cells responsabili non solo dell'inizio ma anche della progressione e recidiva della malattia.

L'analisi immunofenotipica delle putative cancer stem cells nel MM ha evidenziato che questa popolazione può essere distinta dalle plasmacellule; in particolare, pur mantenendo lo stesso idiotipo e le medesime alterazioni molecolari delle plasmacellule mielomatose del paziente, essa presenta le caratteristiche della cellula B della memoria esprimente CD19 e CD27. Queste cellule sono state riscontrate ad una frequenza variabile nel midollo osseo ed anche nel sangue periferico di pazienti con MM (7-9); quando trapiantate in topi NOD SCID, danno origine a plasmacellule clonali che ricapitolano le caratteristiche del MM, quali la produzione di immunoglobuline monoclonali e la compromissione ossea (10). Rilevante è il dato che queste cellule non esprimono CD138, il marker specifico delle plasmacellule terminalmente differenziate sia normali che patologiche. Infatti solo cellule CD138^{neg} esprimenti antigeni di superficie delle cellule B della memoria sono in grado di formare colonie tumorali; esse mantengono questa capacità se ripiastrate serialmente e producono tumori se iniettate in topi immunodeficienti (11, 12). Questo ultimo dato è però controverso in quanto è stato anche dimostrato in topi SCID la capacità di impianto e replicazione nelle cellule CD138^{pos} (13); è possibile che queste differenze possono essere relative ai diversi modelli sperimentali utilizzati.

Studi *in vitro* hanno evidenziato che anche nelle linee continue da MM (HMCL) è presente una piccola popolazione cellulare CD138^{neg} (2-5% delle cellule totali) che esprime CD19 e CD20 e mantiene le stesse immunoglobuline di superficie caratteristiche della linea cellulare. Queste cellule se ripiastrate serialmente in metilcellulosa acquistano una capacità clonogenica molto più elevata delle cellule CD138^{pos} manifestando inoltre un'elevata resistenza ai farmaci (14). La capacità di dare colonie *in vitro* è anche una caratteristica delle cellule CD138^{neg}/CD34^{neg} isolate dai pazienti con MM e si è osservato che l'efficienza dell'attività clonogenica correla con lo stadio della malattia ed è significativamente ridotta dal trattamento con rituximab (15, 16). È comunque necessario sottolineare che i dati relativi a questi studi sono ancora molto limitati e non è ancora chiaro sia nel MM murino che umano se questa eterogenità funzionale oltre che fenotipica, rappresenti la capacità proliferativa di una limitata e funzionalmente unica sottopopolazione di cancer stem cells o, alternativamente, se questa potenzialità sia di tutte le cellule ma solo alcune la esprimano in momenti e condizioni particolari (17). A questo proposito, è stato ipotizzato che le plasmacellu-

le da MM posseggano una “plasticità” fenotipica in quanto sarebbero in grado di de-differenziare in cellule con un fenotipo più immaturo e resistenti all’apoptosi indotta da steroide. In particolare, plasmacellule caratterizzate da elevata espressione degli antigeni CD38 e CD138 ed assenza di CD19 e CD34 quando co-coltivate a lungo termine con osteoclasti darebbero origine a cellule con bassa espressione di CD38 e CD138, e moderata espressione di CD19 e CD34 (18).

Come implicito nella loro definizione, le cancer stem cells condividono con le cellule staminali adulte normali la proprietà di automantenersi e la capacità di dar origine a cellule terminalmente differenziate (19). Differentemente dalle cellule staminali della maggioranza dei tessuti, le cellule B rappresentano un compartimento cellulare già orientato e che non possiede un potenziale differenziativo verso linee diverse, ma per contro conservano la capacità di “self-renewal” in momenti diversi della differenziazione. Questa proprietà è legata alle cellule coinvolte nelle risposte immunitarie per garantire il più alto grado di specificità e mantenere la memoria immunitaria. Un recente lavoro sottolinea questo aspetto dimostrando che le cellule B e T della memoria condividono con le cellule staminali ematopoietiche un programma trascrizionale specifico.²⁰ Per il mantenimento delle loro proprietà le cellule staminali necessitano di un particolare microambiente denominato “nicchia” con il quale interagiscono attraverso molecole di adesione e fattori paracrini. In particolare, le cellule staminali ematopoietiche trovano la loro nicchia nel midollo osseo dove elementi cellulari diversi intervengono nella produzione di citochine, molecole d’adesione e fattori angiogenici a regolare la corretta funzionalità dei diversi compartimenti cellulari. Analogamente, si ritiene che anche le cancer stem cells necessitino di una nicchia che supporti funzionalmente la loro sopravvivenza ed attività: ad esempio le cellule tumorali da leucemia mieloide acuta e leucemia mieloide cronica devono esprimere CD44 per l’homing nel midollo e lo sviluppo della malattia (21-23). Come detto sopra, nel MM l’interazione delle PC con il microambiente midollare è rilevante per lo sviluppo e la progressione della malattia; inoltre alterazioni delle PC quali la deregolata espressione di alcuni fattori, si ripercuotono sulla funzionalità di altre cellule del midollo quali osteoclasti ed osteoblasti. Anche se al momento non ci sono dati specifici sull’interazione tra microambiente midollare e cancer stem cell del MM è evidente l’interesse che tale studio potrà avere anche rispetto a nuovi possibili interventi terapeutici. Infine, analogamente a quanto riscontrato nelle staminali normali, le “cancer stem cells” sono relativamente resistenti all’azione citotossica delle terapie convenzionali. In particolare, è stato dimostrato sia in linee continue che in MM primari che farmaci a differente meccanismo d’azione quali desametasone, lenalidomide, bortezomid e 4-idrossiciclofosfamida sono attivi sulle plasmacellule CD138^{pos} mentre hanno un limitato effetto sui precursori CD138^{neg} (24). Queste osservazioni fanno ipotizzare che alcuni pathways di signaling siano comuni ed attivi sia nelle cellule staminali normali che tumorali. A tale riguardo recenti studi hanno evidenziato come alcune vie di trasmissione del segnale che coinvolgono specifici pathways quali Notch, Wnt and Hedgehog, attivi durante lo sviluppo embrionale e coinvolti nella patogenesi di diversi tumori, siano importanti regolatori dell’omeostasi delle cel-

lule staminali adulte (25, 26). In particolare per quanto riguarda il MM, è stato evidenziato che questi tre pathways sono particolarmente rilevanti nella biologia delle plasmacellule normali e nella loro controparte maligna.

I geni NOTCH appartengono ad una famiglia evolutivamente conservata di recettori transmembrana espressi nel pool cellulare proliferativo che influenzano meccanismi cellulari importanti durante lo sviluppo embrionale e nell'adulto (27-29), suggerendo che questi geni sono direttamente coinvolti nell'attività proliferativa delle cellule immature. Tra i numerosi geni la cui trascrizione è attivata da questo pathway si riscontrano NF κ B2 e IL-6, il più importante fattore di crescita per le plasmacellule, prodotto prevalentemente dallo stroma midollare (30, 31). È quindi conseguente che l'attivazione del signaling NOTCH determini un'aumentata proliferazione delle plasmacellule. È stato dimostrato che il ligando di NOTCH, JAG2, risulta overespresso in linee di mieloma e plasmacellule ottenute da pazienti con MM come risultato di una ipometilazione del suo promoter. JAG2 sostiene la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule staminali ematopoietiche attraverso il contatto cellula-cellula con lo stroma midollare; nel microambiente del midollo quindi l'overespressione di JAG2 nelle cellule mielomatose attiva il signaling NOTCH che induce la produzione e secrezione di IL-6, VEGF e IGF-1 da parte delle cellule stromali che a loro volta stimolano la proliferazione delle plasmacellule in un loop paracrino (32, 33). Queste osservazioni evidenziano l'importanza del pathway NOTCH nel MM e ne suggeriscono un ruolo nella sua patogenesi; bisogna però sottolineare che al momento non ci sono evidenze sperimentali che dimostano in modo specifico l'attivazione preferenziale del questo pathway nelle cancer stem cell del MM.

Il pathway WNT include una classe di fattori di crescita che promuovono la proliferazione delle cellule staminali/progenitrici (34-36) ed ha un ruolo importante nella linfopoiesi precoce in quanto contribuisce alla sopravvivenza ed espansione dei precursori specifici. In seguito ad attivazione del pathway, l'evento chiave è la stabilizzazione della β -catenina che si accumula nella sua forma non fosforilata e trasloca nel nucleo dove interagisce con TCF (T cell factor) ad indurre la trascrizione dei geni target, tra cui ciclina D1 MYC (38, 39) CD44 (40) e MET (41). È stato dimostrato che le plasmacellule di MM overesprimono β -catenina e l'attivazione del signaling induce la sua traslocazione nucleare; come conseguenza si ha un aumento di 2-4 volte della proliferazione cellulare (42). Inoltre il signalling WNT negli osteoblasti regola il processo di osteoclastogenesi attraverso la attivazione/inattivazione differenziale di RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand) e OPG (Osteoprotegerina). Nel mieloma questa regolazione risulta essere compromessa in quanto le PC mielomatose overesprimono il fattore DKK1, un inibitore solubile del signalling WNT, e questa anomalia si ritiene possa contribuire allo sviluppo delle lesioni osteolitiche associate al MM (43, 44). Pertanto le molecole del signaling sono al presente considerate un putativo target terapeutico. Anche riguardo al signaling WNT non ci sono però ancora dati ottenuti in modo specifico nelle cancer stem cells di MM.

Il pathway hedgehog (Hh) è anch'esso altamente conservato nell'evoluzione e la sua attivazione mediante i suoi tre ligandi (Sonic SHH, Indian IHH e Desert

DHH) contribuisce alla definizione di specifici patterns tissutali. Il signalling Hh è controllato principalmente da due proteine transmembrana: il tumore-soppressore Pached (PTC) ed proto-oncogene Smoothened (SMO) (45). In condizioni di resting, PTC sopprime l'attività di SMO.

L'attivazione del signalling determina l'inibizione di PTC e la conseguente attivazione di SMO che a sua volta attiva i fattori trascrizionali GLI, appartenenti alla famiglia delle proteine Kruppel, regolatori della sopravvivenza e proliferazione cellulare (46). In particolare, un recente lavoro ha riportato che nel topo Gli1 regola la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche e delle cellule progenitrici della linea mieloide (47).

Anomalie nel signalling Hh sono presenti in diversi tumori (48-50) ed alcuni modelli murini suggeriscono che esso potrebbe contribuire all'origine e sviluppo di una popolazione aberrante di cellule progenitrici che costituirebbe il pool delle cancer stem cells.

In un recente lavoro del gruppo di Matsui il pathway Hh è stato analizzato nelle putative cancer stem cells di MM. I risultati riportati indicano che:

1. il pathway è attivato preferenzialmente nelle cellule staminali tumorali tramite l'up-regolazione di SMO,
2. la sua ulteriore attivazione determina l'espansione del pool cellulare staminale senza indurre differenziazione e
3. la sua inibizione con ciclopamina (un antagonista del signalling Hh che agisce su SMO) determina una riduzione significativa della attività clonogenica delle cellule tumorali (51).

Recentemente è stato anche riportato come il pathway Hh sia necessario per il mantenimento delle stem cells emopoietiche sia normali che neoplastiche, in particolare nella leucemia mieloide cronica (52).

In conclusione, possiamo affermare che nel MM vi è la concreta evidenza del potenziale clonogenico di cellule clonotipiche circolanti con caratteristiche simili alle cellule B della memoria, sebbene al momento l'esatto fenotipo di queste cellule clonogeniche non è stato definitivamente stabilito. Si può ritenere che l'aumento delle nostre conoscennze nella biologia della malattia, come la identificazione di categorie prognostiche basate su alterazioni genetiche o profili trascrizionali globali potrà dare un contributo importante alla definizione della cancer stem cell nel MM.

Bibliografia

1. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 495-527.
2. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 165-196.
3. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 230-242.

4. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2004; 351: 1860-1873.
5. Bergsagel DE, Valeriote FA. Growth characteristics of a mouse plasma cell tumor. *Cancer Res.* 1968; 28: 2187-2196.
6. Hamburger AW, Kim MB, Salmon SE. The nature of cells generating human myeloma colonies in vitro. *J Cell Physiol.* 1979; 98: 371-376.
7. Pilarski LM, Giannakopoulos NV, Szczepek AJ, et al. In multiple myeloma, circulating hyperdiploid B cells have clonotypic immunoglobulin heavy chain rearrangements and may mediate spread of disease. *Clin.Cancer Res.* 2000; 6: 585-596.
8. Rasmussen T, Kastrup J, Knudsen LM, Johnsen HE. High numbers of clonal CD19+ cells in the peripheral blood of a patient with multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1999; 105: 265-267.
9. Zojer N, Schuster-Kolbe J, Assmann I et al. Chromosomal aberrations are shared by malignant plasma cells and a small fraction of circulating CD19+ cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol.* 2002; 117: 852-859.
10. Pilarski LM, Hipperson G, Seeberger K, et al. Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease: engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice. *Blood.* 2000; 95: 1056-1065.
11. Matsui W, Wang Q, Barber JP et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res.* 2008; 68: 190-197.
12. Matsui W, Huff CA, Wang Q, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004; 103: 2332-2336.
13. Yata K, Yaccoby S. The SCID-rab model: a novel in vivo system for primary human myeloma demonstrating growth of CD138-expressing malignant cells. *Leukemia.* 2004; 18: 1891-1897.
14. Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res.* 2008; 68: 190-197.
15. Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res.* 2008; 68: 190-197.
16. Matsui W, Huff CA, Wang Q, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004; 103: 2332-2336.
17. Huff CA, Matsui W. Multiple myeloma cancer stem cells. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2895-2900.
18. Yaccoby S. The phenotypic plasticity of myeloma plasma cells as expressed by dedifferentiation into an immature, resilient, and apoptosis-resistant phenotype. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 7599-7606.
19. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111.
20. Uckey CJ, Bhattacharya D, Goldrath AW et al. Memory T and memory B

- cells share a transcriptional program of self-renewal with long-term hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 3304-3309.
21. Iwasaki H, Suda T. Cancer stem cells and their niche. *Cancer Sci*. 2009; 100: 1166-1172.
 22. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006; 12: 1167-1174.
 23. Krause DS, Lazarides K, von Andrian UH, Van Etten RA. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006; 12: 1175-1180.
 24. Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res*. 2008; 68: 190-197.
 25. Houde C, Li Y, Song L, et al. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood* 2004; 104: 3697-3704.
 26. Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001; 411: 349-354.
 27. Miele L, Osborne B. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol*. 1999; 181: 393-409.
 28. Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene*. 2003; 22: 6598-6608.
 29. Rtavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999; 284: 770-776.
 30. Oswald F, Liptay S, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. *Mol Cell Biol*. 1998; 18: 2077-2088.
 31. Palmieri M, Sasso MP, Monese R, et al. Interaction of the nuclear protein CBF1 with the kappaB site of the IL-6 gene promoter. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27: 2785-2791.
 32. Houde C, Li Y, Song L, et al. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood* 2004; 104: 3697-3704.
 33. Jundt F, Probsting KS, Anagnostopoulos I, et al. Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood*. 2004; 103: 3511-3515.
 34. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, et al. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*. 2000; 13: 15-24.
 35. Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003; 423: 409-414.
 36. van de WM, de LW, Clevers H. WNT signaling and lymphocyte development. *Cell*. 2002; 109 (Suppl): S13-S19.
 37. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999; 398: 422-426.
 38. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999; 398: 422-426.

39. van de WM, de LW, Clevers H. WNT signaling and lymphocyte development. *Cell*. 2002; 109 (Suppl): S13-S19.
40. Wielenga VJ, van der NR, Offerhaus GJ, Pals ST. CD44 glycoproteins in colorectal cancer: expression, function, and prognostic value. *Adv Cancer Res*. 2000; 77: 169-187.
41. Boon EM, van der NR, van de WM, Clevers H, Pals ST. Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2002; 62: 5126-5128.
42. Derksen PW, Tjin E, Meijer HP, et al. Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 6122-6127.
43. Giuliani N, Morandi F, Tagliaferri S, et al. Production of Wnt inhibitors by myeloma cells: potential effects on canonical Wnt pathway in the bone microenvironment. *Cancer Res*. 2007; 67: 7665-7674.
44. Qiang YW, Chen Y, Stephens O, et al. Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood*. 2008; 112: 196-207.
45. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature*. 2002; 418: 892-897.
46. Altaba A, Sanchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 361-372.
47. Merchant A, Joseph G, Wang Q, Brennan S, Matsui W. Gli1 regulates the proliferation and differentiation of HSC and myeloid progenitors. *Blood*. 2010.
48. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*. 2003; 425: 846-851.
49. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*. 2004; 431: 707-712.
50. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, et al. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*. 2003; 422: 313-317.
51. Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, et al. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 4048-4053.
52. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*. 2009; 458: 776-779.

Recidive tardive delle emopatie maligne: come prevenirle?

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia
Consulente ematologo presso l'IRCCS Fondazione "Salvatore Maugeri", Pavia

È prassi clinica corrente ritenere "tardiva" una recidiva che si verifica dopo più di 5 anni liberi da malattia, trascorsi dal completamento della terapia primaria, in pazienti affetti da una neoplasia. Specie in casi di un'emopatia maligna ad elevata aggressività, tali recidive tardive sono anche "inaspettate". Tuttavia, la loro osservazione non è eccezionale. Vengono quindi presentati e discussi alcuni casi clinici di leucemia acuta e di linfoma ad alta malignità, andati incontro a remissione completa dopo trattamenti intensivi e ricaduti a distanza di parecchi anni, quando si riteneva di aver raggiunto la guarigione.

L'osservazione di tali recidive tardive si spiega con la persistenza di una malattia minima residua non evidenziabile (almeno con le possibilità diagnostiche attualmente utilizzate in clinica) al termine della terapia primaria della leucemia o linfoma, e con la lunga permanenza di poche CSL (cellule staminali leucemiche o linfomatose) "dormienti", nascoste in nicchie tessutali. Queste CSL dormienti, che per anni non entrano in ciclo replicativo e non si differenziano, sono resistenti ai farmaci citotossici usualmente utilizzati per ridurre la massa tumorale formata da cellule proliferanti. Per una eradicazione delle CSL, necessaria per prevenire le recidive e raggiungere la guarigione, si deve quindi ricorrere a farmaci che agiscano indipendentemente dal ciclo cellulare e a strategie terapeutiche che tengano conto di peculiarità biologiche delle CSL e dei meccanismi dei loro legami di nicchia.

Microambiente e neoplasie ematologiche

Ricerche condotte negli ultimi anni hanno dimostrato con sempre maggiore evidenza il ruolo svolto dal microambiente tessutale nei meccanismi di insorgenza e progressione di una neoplasia ematologica. Questo ruolo si prospetta però differente nelle varie emopatie maligne, e nel tentativo di interpretare tali differenze è innanzitutto opportuno ricordare le nozioni fondamentali su cui si basa il concetto di nicchia di cellula staminale. Tale concetto è emerso come un'ipotesi complementare dopo la dimostrazione sperimentale dell'esistenza della cellula stami-

nale ematopoietica, fatta da Till e McCulloch nel 1961. Infatti, è parso logico ritenere che debba esistere un posto specializzato e protetto, dove la cellula staminale è localizzata e regolata nello svolgimento delle proprie funzioni.

Il concetto di nicchia di cellula staminale è stato proposto per primo da Schofield nel 1978, cercando di spiegare l'apparente paradosso inerente al fatto che cellule di midollo osseo, ottenute da topo sia giovane che vecchio, trapiantate in un altro topo W/W^v (con mutazione in kit) conservano indefinitamente la capacità di ricostituire l'ematopoiesi. Schofield ha indicato anche i criteri fondamentali che precisano il concetto di nicchia di cellula staminale:

1. una ben definita sede anatomica,
2. un luogo dove le cellule staminali possono essere sostenute e riprodursi,
3. un posto dove la differenziazione è inibita,
4. uno spazio limitato come pure limitato è il numero delle cellule staminali,
5. un posto dove il ritorno ad un fenotipo di cellula staminale potrebbe essere indotto in una cellula di un tipo lievemente più maturo.

Schofield non aveva nessuna dimostrazione diretta di alcuno di questi criteri, e dovette far fronte a scetticismo e pareri diversi nell'ambito della comunità ematologica, ma la sua ipotesi era del tutto corretta. Essa venne poi dimostrata, in un tessuto e modello sperimentale completamente diversi (ovaio di *Drosophila melanogaster*), nel 1998 da Xie e Spradling.

Gli studi più recenti hanno enormemente accresciuto le nostre conoscenze sul microambiente osteomidollare, le cui cellule stromali sono composte da fibroblasti, adipociti, cellule endoteliali e osteoblasti. Queste sono la maggior sorgente di fattori di crescita e citochine in condizioni normali e patologiche. La composizione delle cellule stromali è alterata in modo differente nelle varie emopatie maligne, e ciò contribuisce a creare differenze nel microambiente tessutale. Consideriamo ad esempio le leucemie acute mieloidi (LAM) e linfatiche (LAL), e le interazioni fra blasti leucemici e cellule stromali (Ayala et al., 2009). Sia i blasti leucemici che le cellule stromali producono *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) ed altri mediatori proangiogenici, che hanno anche effetti autocrini e paracrini protumorali. Le integrine e il CXCR4 sono fondamentali per l'adesione dei blasti allo stroma, e mediano l'*homing* dei blasti e la persistenza di malattia residua dopo il trattamento. Esistono però differenze fra LAM e LAL; queste ultime sono più dipendenti da bFGF che da VEGF come mediatore proangiogenico. Inoltre, nelle LAL il microambiente è più ricco in interleuchine e in asparaginasi-sintetasi; è questo un meccanismo di resistenza alla terapia.

Le relazioni esistenti fra cellule neoplastiche del sangue e microambiente presentano quindi aspetti differenti nelle diverse neoplasie ematologiche. Gli scenari possibili sono stati di recente ben riassunti da Burger et al. (2009) in tre modelli principali, la cui definizione può fornire un'utile traccia per futuri trattamenti mirati sui legami di nicchia fra cellula neoplastica e stroma.

Il primo modello è rappresentato dalla mancanza di interconnessioni con il network microambientale, e si verifica quando la mutazione genetica fornisce alle cellule trasformate un vantaggio proliferativo sostenuto, che è largamente indi-

pendente dai segnali microambientali. Un esempio tipico è il linfoma di Burkitt, in cui praticamente tutte le cellule maligne sono proliferanti a causa della traslocazione cromosomica, che conduce ad un'attivazione perenne del gene *c-myc*. Nel linfoma di Burkitt il microambiente sembra quindi avere solo un limitato ruolo nel pianificare nuove strategie di trattamento.

Il secondo modello è un ambiente disfunzionale, in cui le cellule neoplastiche sono impegnate in interazioni sregolate con lo stroma di supporto, che invia alle cellule maligne segnali di crescita e di resistenza ai farmaci. Esempi sono le leucemie acute e le sindromi mielodisplastiche, in cui le LSC sfuggono agli stretti meccanismi di controllo che regolano la crescita e la proliferazione cellulare dentro de nicchie ematopoietiche, e occupano come parassiti il microambiente di supporto. In questo modello è parzialmente conservata la dipendenza delle cellule neoplastiche dalla controparte stromale per l'accrescimento e la sopravvivenza, e ciò può portare alla selezione di subcloni neoplastici dotati di una maggiore affinità per il microambiente. Quindi, in queste malattie può essere giustificato dirigere la terapia sul microambiente, nel tentativo di bersagliare subcloni dipendenti dallo stroma, che altrimenti sopravviverebbero ai trattamenti convenzionali e preparerebbero il terreno per una ricaduta.

Il terzo modello è rappresentato da una coesistenza, regolata e amichevole, fra cellule maligne e microambiente. Tale modello sembra esistere in alcune neoplasie linfatiche a cellule B, come la leucemia linfatica cronica, i linfomi follicolari, i linfomi mucosa-associati e il mieloma multiplo. In queste malattie le interazioni fra cellule maligne e microambiente assomigliano parecchio al comportamento che le corrispondenti cellule B normali presentano nei confronti dei rispettivi microambienti. Conseguentemente, l'impulso proliferativo per le cellule maligne è, almeno all'inizio, largamente dipendente dai segnali esterni che provengono dal microambiente, quali antigeni, citochine e interazioni cellula-cellula. In questo modello le cellule neoplastiche vanno incontro ad apoptosi, a meno che la loro sopravvivenza venga rinforzata da questi stimoli esterni. Queste interazioni non sono colpite dai nostri attuali trattamenti convenzionali, e ciò spiega perché queste linfopatie croniche, nonostante i recenti progressi terapeutici, rimangono incurabili. Sulla base di questo concetto, tali malattie dovrebbero essere particolarmente responsive ad approcci terapeutici mirati sul microambiente.

Terapie mirate sulle CSL e sulle loro relazioni di nicchia

Il concetto di CSL come modello di crescita e progressione tumorale e le nuove conoscenze sul microambiente (nicchia) tessutale hanno di recente stimolato la ricerca di terapie antitumorali in un'area, che sino ad ora non era stata focalizzata. Bersagli di queste terapie mirate possono essere (1) l'espressione di marcatori alla superficie cellulare, (2) differenze dei meccanismi di *self-renewal* fra CSL e cellule staminali normali, (3) le relazioni fra CSL e microambiente. È da sottolineare che un agente terapeutico mirato su un bersaglio può agire anche attraverso un meccanismo che coinvolge un altro bersaglio (ad esempio, un anticorpo diretto verso una molecola di adesione coinvolge anche i legami CSL-nicchia).

Farmaci che agiscono indipendentemente dal ciclo cellulare sono gli anticorpi monoclonali diretti contro antigeni di superficie della cellula neoplastica. Il loro impiego può realizzare in clinica una terapia mirata anti-CSL, quale ad esempio già ora viene attuata con successo nelle linfopatie CD20+ mediante l'utilizzo di un anticorpo anti-CD20. Infatti, l'aggiunta di tale anticorpo alla chemioterapia convenzionale in pazienti affetti da linfoma follicolare o da linfoma a grandi cellule, ha consentito di ottenere una riduzione sia della malattia minima residua al termine della terapia primaria, sia del numero delle ricadute (Rambaldi et al., 2002).

Negli ultimi anni un grande interesse è stato rivolto, per il loro potenziale ruolo nella ricerca di agenti anti-CSL, allo studio dei segnali di percorso importanti per il *self-renewal* delle cellule staminali, quali il Wnt, Notch e Hedgehog (Hh) (la rilevanza di tali percorsi era già stata in precedenza dimostrata sia per la biologia dello sviluppo che per processi di oncogenesi). Un esempio al riguardo è la recente osservazione che il segnale Hh è essenziale per il mantenimento delle CSL nella leucemia mieloide (Zhao et al., 2009). Altri studi suggeriscono che si potrebbero utilizzare effetti di inibizione selettiva dei percorsi Pten/Akt e NF- κ B nelle CSL, nei confronti delle cellule staminali ematopoietiche normali (Xu et al., 2003; Yilmaz et al., 2006).

Per quanto riguarda terapie mirate su legami di nicchia nel tentativo di eradicare le CSL, le molecole di adesione CD44 e CKCR4 appaiono un bersaglio interessante. CD44 è importante per l'homing e l'attecchimento di cellule staminali della LAM (Jin et al., 2006) e BCR-ABL-positive della LMC (Krause et al., 2006), nel modello dello xenotrapianto in topo NOD/SCID. In entrambi gli studi, il blocco di CD44 ottenuto con anticorpi ha portato al fallimento dell'attecchimento di queste leucemie. Un'altra strategia interessante può essere inibire CXCR4, sia con anticorpi che con agenti chimici. Il composto AMD3465, antagonista di CXCR4, ha dimostrato di prevenire gli effetti chemioprotettivi dell'interazione cellule stromali-leucemia (Zeng et al., 2009). Un ulteriore studio condotto in pazienti affetti da leucemia acuta promielocitica ha dimostrato una mobilitazione di cellule leucemiche ed un'augmentata chemiosensibilità nella dopo trattamento con AMD3100 (Nervi et al., 2009), un altro antagonista di CXCR4 molto studiato nella mobilitazione di cellule staminali ematopoietiche normali. Questo fenomeno appare simile a quello benefico osservato con la terapia con G-CSF nella LAM (Lowenberg et al., 2003), anche se rimane ancora da chiarire se gli effetti osservati siano mediati attraverso un sinergismo citotossico, o esprimano la prevenzione di una chemioprotezione derivata dalle cellule stromali, oppure il risultato di una specifica azione mirata su CSL attraverso qualche altro meccanismo (quale ad esempio uno stimolo ad entrare in ciclo).

Con riferimento alle peculiarità citocinetiche delle CSL, una strategia terapeutica molto attrattiva sarebbe quella di indurle ad uscire dallo stato di quiescenza e di entrare in ciclo; infatti, una loro mobilitazione dalla nicchia e iniziale differenziazione le renderebbe sensibili all'azione di farmaci citotossici. Il maggiore ostacolo all'applicazione clinica di tale strategia deriva però dalla difficoltà di trovare una finestra terapeutica che risparmi le cellule staminali normali. Questo set-

tore di studi è appena iniziato, ed è certamente ancora necessario un grande sforzo di ricerca per trovare i migliori algoritmi nel formulare in clinica strategie terapeutiche innovative, specificamente mirate contro le CSL.

Bibliografia

1. Ayala F, Dewar R, Kieran M, et al. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia*. 2009; 23: 2233.
2. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, et al. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009; 114: 3367.
3. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006; 12: 1167.
4. Krause DS, Lazarides K, von Andrian UH, et al. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006; 12: 1175.
5. Lowenberg B, van Putten W, Theobald M, et al. Effect of priming with granulocyte colony-stimulating factor on the outcome of chemotherapy for acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 349: 743.
6. Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, et al. Chemosensitization of AML following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood*. 2009; 113: 6206.
7. Rambaldi A, Lazzari M, Manzoni C, et al. Monitoring the minimal residual disease after CHOP and rituximab in previously untreated patients with follicular lymphoma. *Blood*. 2002; 99: 856.
8. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haematopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; 4: 7.
9. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Ares*. 1961; 14: 213.
10. Xie T, Spradling AC. Decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the drosophila ovary. *Cell*. 1998; 94: 251.
11. Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, et al. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*. 2003; 102: 972.
12. Yilmaz OM, Valdez R, Theisen BK, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*. 2006; 441: 475.
13. Zeng Z, Shi YX, Samudio IJ, et al. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood*. 2009; 113: 6215.
14. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*. 2009; 458: 776.

**CELLULE STAMINALI
NEI TUMORI SOLIDI**

Cellule staminali nel tumore della mammella: dal laboratorio alla pratica clinica

Maria Grazia Daidone, Guido Santilli, Mara Binda, Nadia Zaffaroni

Unità Operativa Ricerca Traslazionale, Dipartimento di Oncologia Sperimentale e Medicina Molecolare, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Nei tessuti adulti normali, il mantenimento della popolazione cellulare si deve ad una piccola frazione di cellule, le cellule staminali, che si dividono asimmetricamente autorinnovandosi e dando origine a progenitori cellulari che, dopo un numero limitato di divisioni, producono cellule differenziate tessuto-specifiche, non più in grado di dividersi. È ampiamente accertato che i tumori sono entità eterogenee per quanto riguarda il potenziale proliferativo, fenotipico e tumorigenico, e recentemente si è dimostrato che esiste, all'interno della massa neoplastica, una frazione numericamente esigua di cellule (1-2% dell'intera popolazione tumorale) che è la sola in grado di rigenerare il tumore *in vivo*, mentre popolazioni di cellule più differenziate mancano di questa proprietà. Tali cellule sono simili alle cellule staminali per alcune caratteristiche, quali l'autorinnovamento, lo stato indifferenziato, la multipotenzialità (ovvero la capacità di generare cellule mature appartenenti a diversi stipiti cellulari). In base a queste e ad altre evidenze sperimentali si è così giunti a ritenere che il tumore origini da una cellula staminale adulta, anziché da una qualsiasi cellula somatica, oppure da una cellula che riacquisisce caratteristiche di staminalità, e in tale contesto lo sviluppo della neoplasia viene ad essere considerato un'organogenesi aberrante originata e sostenuta da cellule staminali mutate, denominate cellule staminali tumorali.

La dimostrazione formale della presenza di una frazione di cellule autorinnovantesi che, seppur esigua, è in grado di rigenerare il tumore si è inizialmente avuta nella leucemia mieloide acuta grazie alla disponibilità di sistemi sperimentali per l'identificazione dei fenotipi caratterizzanti i differenti stipiti cellulari (1) e alla dimostrazione della capacità di ripopolazione delle cellule staminali leucemiche in idonei modelli murini (2). Recentemente sono state messe a punto condizioni sperimentali per l'isolamento e la propagazione di cellule staminali/progenitori oltre che nei mielomi (3) anche da neoplasie solide. Utilizzando tecniche impiegate per l'isolamento di cellule staminali da tessuto normali (basate su un approccio prospettico - quale l'isolamento in base all'espressione di marcatori di super-

ficie o alla capacità di escludere il colorante vitale Hoechst 33342, o funzionale – quale la crescita clonale in vitro come sfere non adese) si è così giunti alla dimostrazione dell'esistenza di cellule presentano alcuni dei caratteri di staminalità nei tumori del sistema nervoso centrale (4-6), nei carcinomi della mammella (7-10), della prostata (11), dell'ovaio (12), del colon (13, 14), della testa e collo (15) e del pancreas (16), negli epatocarcinomi (17) e nei melanomi maligni (18). Tali cellule - diversamente dalla popolazione cellulare di origine - presentano un elevato potenziale tumorigenico poiché in grado di dar origine a tumore quando inoculate nell'animale a concentrazioni molto basse (Tab. 1). Si è inoltre dimostrato che la frazione con caratteristiche di staminalità è quantitativamente modesta, e che la restante popolazione cellulare è destinata a differenziamento e senescenza.

Mentre cellule staminali normali e tumorali condividono molte caratteristiche molecolari e funzionali, la regolazione dell'auto-rinnovamento cellulare attraverso i pathways di Wnt, BMI-1, Notch, Hedgehog, operativo e strettamente controllato nelle cellule staminali normali, è del tutto alterata nelle cellule staminali tumorali e la conoscenza delle alterazioni molecolari che lo sostengono (e che già caratterizzano molte neoplasie solide e sistemiche) viene ad essere cruciale per l'identificazione di bersagli molecolari per interventi terapeutici potenzialmente altamente selettivi. Gli attuali trattamenti, disegnati principalmente contro le cellule proliferanti, sono infatti indirizzati ad una riduzione dell'intera massa tumorale e non necessariamente ad un annientamento della frazione staminale/tumorigenica caratterizzata - per contro - da una elevata espressione di proteine appartenenti alla famiglia dei trasportatori di membrana ABC (che favoriscono l'efflusso cellulare di farmaci e sono coinvolti nella resistenza a farmaci quali paclitaxel, cisplatino, 5-fluoruracile, mitoxantrone, methotrexate, antracicline, etoposide, alcaloidi della vinca, camptotecine, topotecan, imatinib), da alterazioni nei meccanismi di riparazione del DNA, dalla presenza di fattori citoprotettivi, quali attivazione di telomerasi ed elevata espressione di fattori anti-

Tab. 1 - Isolamento da tumori umani di cellule staminali/progenitori ad elevato potenziale tumorigenico.

Tipo tumorale	Metodo/marcatore utilizzato per l'isolamento	Riferimento bibliografico
Leucemia mieloide acuta	CD34+CD38- lineage-	2
Mieloma multiplo	CD138-/CD134-	3
Tumori cerebrali	CD133+ Crescita in vitro come sfere in sospensione	4-6
Carcinoma mammario	CD44+CD24-/basso lineage- ALDH1+ Crescita in vitro come sfere in sospensione	7-10
Carcinoma prostatico	CD44+/a2b1high/CD133+	11
Carcinoma ovarico	Crescita in vitro come sfere in sospensione	12
Carcinoma del colon	CD133+	13-14
Tumori del cavo orale	CD44+ lineage-	15
Tumori del pancreas	CD44+CD24+ESA+	16
Epatocarcinoma	CD90+	17
Melanoma	Crescita in vitro come sfere in sospensione	18

apoptotici, e da una relativamente modesta velocità di crescita a fronte di un elevato potenziale proliferativo. Il trattamento, pertanto, malgrado provochi una significativa riduzione della massa tumorale (attualmente considerata indicatore di risposta clinica e, conseguentemente, di sopravvivenza del paziente) può lasciare del tutto inalterata la frazione di cellule staminali tumorali, in grado quindi di proliferare e rigenerare la neoplasia sia a livello locale sia a distanza. Per l'eradicazione del tumore è ipotizzabile sia quindi necessario bersagliare direttamente la cellula staminale tumorale/progenitore tumorigenico (Fig. 1). A tale scopo sono in corso studi per identificare le alterazioni molecolari che sostengono in maniera funzionalmente non ridondante l'autorinnovamento delle cellule ad elevato potenziale tumorigenico e per disegnare e validare a livello preclinico molecole che interferiscano su tali targets.

Per il carcinoma della mammella è stato recentemente dimostrato il significato prognostico di alterazioni molecolari a carico di pathways coinvolti nell'autorinnovamento. In particolare:

Wnt: implicato nella tumorigenesi e nel mantenimento di un pool di cellule sta-

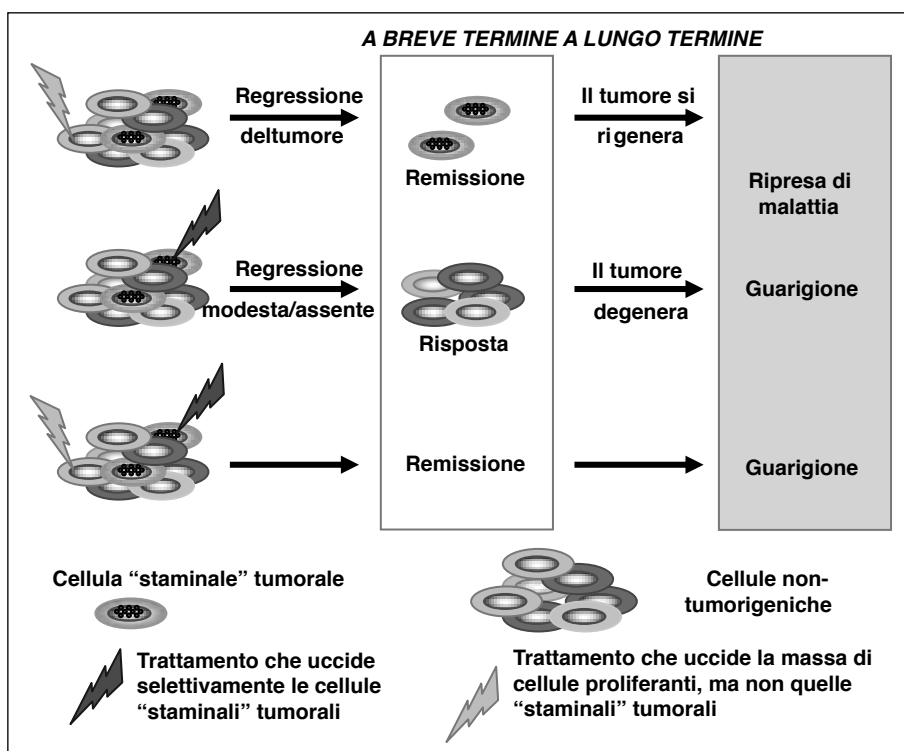


Fig. 1 - Efficacia delle terapie antitumorali in relazione alla presenza di "cellule staminali tumorali": i trattamenti convenzionali potrebbero ridurre la massa tumorale senza eradicare le "cellule staminali tumorali", mentre farmaci che selettivamente colpiscono queste ultime potrebbero per contro non ridurre significativamente la massa tumorale che tuttavia non è più in grado di rigenerare il tumore. L'associazione tra le due strategie terapeutiche potrebbe fornire i risultati migliori per l'eradicazione della malattia.

minali/progenitori nella ghiandola mammaria, è coinvolto in un cross-talk con i recettori per gli ormoni steroidei attraverso pathways comuni e si è dimostrato che l'interferenza sulla sua funzionalità attraverso antagonisti specifici o siRNA aumenta l'espressione di marcatori di differenziamento. Hanno un significato prognostico β -catenina (19), la cui localizzazione intracellulare è differentemente associata con il decorso della malattia (favorevole per l'espressione citoplasmatica, sfavorevole per l'espressione nucleare) e SFRP-1 (secreted frizzled-related protein-1), la cui metilazione del promotore è un fattore sfavorevole (20, 21).

Hedgehog: alterazioni di questo pathway sono implicati nella sviluppo di differenti patologie neoplastiche, inclusa la patologia mammaria. In particolare, Sonic Hedgehog identifica carcinomi mammari infiammatori a differente aggressività biologica (22), mentre la ciclopamina, un alcaloide che interferisce specificamente sul pathway di Hedgehog, riduce l'espressione di Gli1 e rallenta significativamente la crescita tumorale (23).

BMI-1 è uno dei componenti del complesso Polycomb indotto attraverso il pathway di segnalazione di hedgehog responsabile dell'autorinnovamento di cellule staminali normali e leucemiche, reprime geni che inducono senescenza e morte cellulare e immortalizza cellule dell'epitelio mammario umano. Un profilo molecolare basato sull'espressione di 11 geni presenti nel pathway di BMI-1 sembra essere un forte e solido indicatore prognostico, in termini sia di ripresa globale che di metastasi a distanza e di morte, in 11 neoplasie epiteliali e non, comprendenti anche il carcinoma mammario (24).

Notch: ha un ruolo importante in diverse patologie neoplastiche (25): Notch 4 è associato alla tumorigenesi murina e alla proliferazione delle mammosfere (ovvero, delle cellule staminali/progenitori che crescono in sospensione come sfere non adese), tanto che il trattamento con un anticorpo diretto contro Notch 4 sopprime drasticamente la formazione di sfere sia primarie sia secondarie (10, 26). Elementi di questo pathway hanno un significato prognostico in questa patologia (10, 27-29).

Per quanto riguarda la cellula staminale della ghiandola mammaria, recenti evidenze depongono per una sua negatività recettoriale e per la presenza di recettori per estrogeni (ER) nei progenitori e nelle cellule più differenziate. Il momento dello stadio di differenziamento del lineage cellulare al quale corrisponde la trasformazione neoplastica viene ad essere determinante per la storia clinica della neoplasia (Figura 2). Infatti, se la trasformazione neoplastica insorge nella cellula staminale, senza recettori per estrogeni, è verosimile che il tumore sarà di tipo basale, indifferenziato, a prognosi sfavorevole e poco responsivo alle terapie ormonali. Per contro, un tumore generato da cellule ben differenziate, apparterrà verosimilmente al sottotipo luminale A, caratterizzato da buona prognosi ed elevata probabilità di risposta al trattamento ormonale. Ovviamente, al progenitore parzialmente differenziato corrisponderà un tumore con un comportamento clinico e biologico estremamente eterogeneo. Sono attualmente disponibili le prime evidenze sperimentali che dimostrano l'efficacia di nuovi agenti terapeutici sull'autorinnovamento di cellule staminali/progenitori normali (25, 26, 30). Tuttavia, lo stato attuale delle conoscenze depone per una situazione decisamente più complessa di quanto non appaia dagli incoraggianti risul-

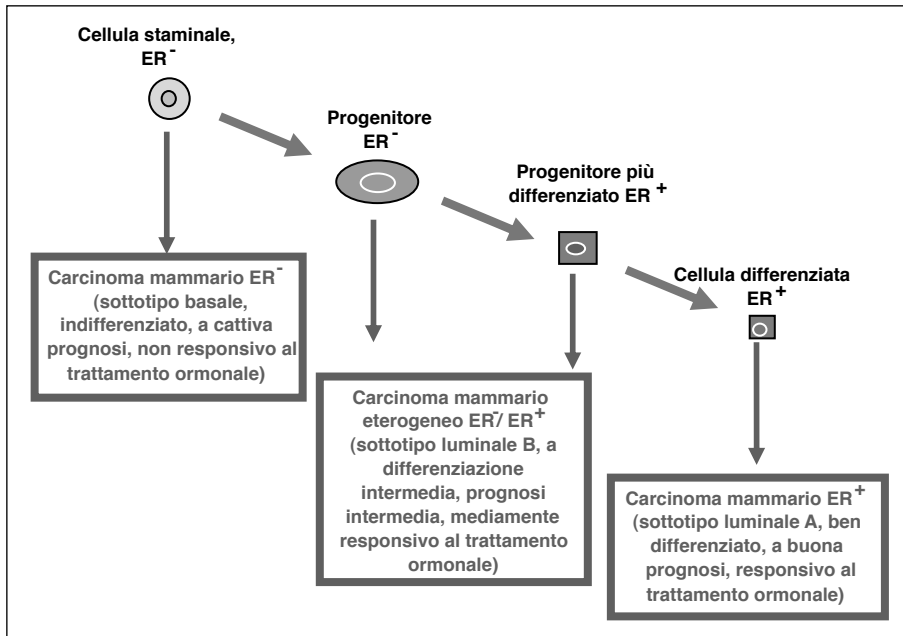


Fig. 2 - Relazione tra stadio di differenziamento del lineage cellulare e tipologia del tumore.

tati preliminari, a livello dell'identificazione sia di marcatori di staminalità, sia di di nuovi bersagli per farmaci innovativi, sia di un modello peculiare per studiare in vitro/in vivo nuove modalità terapeutiche (31). Infatti, come ottimamente messo in evidenza in uno *Special Workshop Report* recentemente pubblicato su *Cancer Research* (32):

- la definizione di cancer stem cell è squisitamente operativa (cellula in grado di autorinnovarsi e dar luogo a stipiti cellulari differenti, in grado di rigenerare continuamente un tumore);
- l'isolamento e la propagazione di cellule staminali/progenitori è estremamente difficile – in mancanza di marcatori che chiaramente identificano la staminalità come nel caso di leucemie e tumori cerebrali – nei tumori solidi e si basa essenzialmente su saggi funzionali in vivo e su condizioni sperimentali non propriamente fisiologiche;
- la crescita in vivo richiede una complessa standardizzazione e tempi di crescita molto lunghi, ovvero condizioni difficilmente utilizzabili per uno screening farmacologico su larga scala;
- per contro, un saggio in vitro deve essere:
 - a) standardizzato e riproducibile,
 - b) quantitativo,
 - c) altamente specifico,
 - d) sufficientemente sensibile,
 - e) rapido.

Tab. 2 - Approcci terapeutici contro cellule staminali/progenitori ad elevato potenziale tumorigenico nel carcinoma mammario.

Modello sperimentale	Agenti chimici/fisici/biologici studiati	Valutazione dell'attività	Riferimento bibliografico
Mammosfere da linee stabilizzate di carcinoma	Radiazioni ionizzanti	Fenotipo, autorinnovamento e marcatori molecolari di radiosensibilità	34
Mammosfere da DCIS	Gefitinib, antagonista di Notch 4	Autorinnovamento	10
Mammosfere da cellule epiteliali normali	Antagonista di Notch	Autorinnovamento e differenziamento	26
Mammosfere da cellule epiteliali normali/tumorali	Ciclopamina	Autorinnovamento, differenziamento e tumorigenesi	30

Oltre a queste condizioni, ancora largamente da mettere realmente a punto nella pratica di laboratorio, restano ancora molti quesiti, sia speculativi sia tecnici, a cui rispondere prima di poter valutare quanto le conoscenze sulla biologia delle cellule staminali/progenitori di cellule tumorali possano contribuire ad una diagnosi precoce, ad una miglior risoluzione prognostica e allo sviluppo di molecole mirate contro alterazioni molecolari associate alla staminalità tumorale. Tuttavia, le più recenti pubblicazione aventi come oggetto informazioni acquisite dalla caratterizzazione molecolare (33) e dal profilo di radiosensibilità (34) di cellule staminali/progenitori isolate da tumori clinici così come da linee cellulari stabilizzate da carcinoma mammario avallano un possibile applicabilità clinica a medio termine di questo modello sperimentale.

Infatti, il profilo di espressione genica derivato da cellule con caratteristiche di staminalità isolate da 6 tumori clinici, seppur indicativo di alterazioni nei geni di invasività piuttosto che in quelli coinvolti nell'autorinnovamento, si dimostra predittore di sopravvivenza globale e libera da malattia non solo su casistiche di carcinoma mammario, ma anche su neoplasie di differente istologia, quali il carcinoma polmonare e prostatico e il medulloblastoma. Inoltre, esistono preliminari dimostrazioni formali, ottenuta da mammosfere propagate *in vitro*, che tali cellule sono relativamente più radioresistenti della popolazione da cui sono state isolate ma mostrano una spiccata sensibilità a farmaci contro specifici bersagli molecolari (Tab. 2).

Bibliografia

1. Siminovitch, et al. J Cell Physiol. 1963; 62: 327-336.
2. Bonnet D, Dick JE. Nat Med. 1997; 3: 730-737.
3. Matsui W, et al. Blood. 2004; 103: 2332-2336.
4. Hemmati, et al. PNAS. 2003; 100: 15178-15183.
5. Singh S, et al. Nature. 2004; 432: 396-401.
6. Galli R, et al. Cancer Res. 2004; 64: 7011-7021.
7. Al-Hajj M, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 3983-3988.

8. Ginestier C, et al. *Cell Stem Cell*. 2007; 1: 555-567.
9. Ponti D, et al. *Cancer Res*. 2005; 65: 5506-5511.
10. Farnie G, et al. *J Natl cancer Inst*. 2007; 99: 616-627.
11. Collins AT, et al. *Cancer Res*. 2005; 65: 10946-10951.
12. Bapat SA, et al. *Cancer Res*. 2005; 65: 3025-3029.
13. Ricci-Vitiani L, et al. *Nature*. 2007; 445: 111-115.
14. O'Brien CA, et al. *Nature*. 2007; 445: 106-110.
15. Prince ME, et al. *PNAS*. 2007; 104: 973-978.
16. Li C, et al. *Cancer Res*. 2007; 67: 1030-1037.
17. Yang ZF, et al. *Cancer Cell*. 2008; 13: 153-166.
18. Fang D, et al. *Cancer Res*. 2005; 65: 9328-9337.
19. Nakapoulou L, et al. *Mod Pathol*. 2006; 19: 556-563.
20. Lo PK, et al. *Cancer Biol Ther*. 2006; 5: 281-286.
21. Veeck J, et al. *Oncogene*. 2006; 25: 3479-3488.
22. Bièche I, et al. *Clinical Cancer Res*. 2004; 10: 6789-6795.
23. Kubo M, et al. *Cancer Res*. 2004; 64: 6071-6074.
24. Glinisky GV, et al. *J Clin Invest*. 2005; 115: 1503-1521.
25. Stylianou S, et al. *Cancer Res*. 2006; 66: 1517-1525.
26. Dontu G, et al. *Breast Cancer Res*. 2004; 6: 605-615.
27. Parr C, et al. *Int J Mol Med*. 2004; 4: 779-786.
28. Reedijk M, et al. *Cancer Res*. 2005; 65: 8530-8537.
29. Colaluca IN, et al. *Nature*. 2008; 451: 76-81.
30. Liu M, et al. *Cancer Res*. 2006; 66: 6063-6071.
31. Hill RP. *Cancer Res*. 2006; 66: 1891-1896.
32. Clarke MF, et al. *Cancer Res*. 2006; 66: 9339-9344.
33. Liu R, et al. *N Engl J Med*. 2007; 356: 217-226.
34. Phillips TM, et al. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98: 1777-1785.

Cellule tumorali circolanti nel decorso clinico del tumore della mammella

Maria Teresa Sandri

Direttore U.O. Medicina di Laboratorio, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

La ricerca di cellule tumorali circolanti (CTC) nel sangue periferico di pazienti affetti da tumori maligni è un argomento che rappresenta un interessante campo di ricerca da più di un secolo: la prima segnalazione risale infatti al 1869, ad opera di un patologo austriaco che descrisse la presenza di CTC su uno striscio di sangue effettuato prelevando il campione da un paziente deceduto per una neoplasia epiteliale. Le CTC rappresentano il primo passo nel processo di metastatizzazione per via ematogena, e il loro studio può permettere una migliore comprensione della biologia del tumore e delle metastasi stesse.

Il primo problema che ha dovuto essere affrontato in questo ambito è relativo alla messa a punto di metodiche riproducibili e sufficientemente sensibili e specifiche per la rilevazione delle CTC: esse sono infatti un evento molto raro (1 CTC ogni 10^{5-7} cellule mononucleate del sangue) e diversi approcci tecnologici sono stati utilizzati, disegnati però in maniera così diversa da impedirne la confrontabilità. Ad oggi l'attenzione si è ristretta su due tipi di metodiche: la prima prende in considerazione l'analisi degli acidi nucleici per la rilevazione di alcune sequenze o geni differentemente espressi nelle cellule tumorali e nei componenti del sangue, la seconda utilizza la citofluorimetria, che mediante metodi immunocitochimici permette la identificazione e la caratterizzazione delle singole cellule tumorali.

La maggior parte dei metodi prevede comunque una fase iniziale di arricchimento del campione, in cui mediante tecniche di separazione per gradiente, o di filtrazione o infine di separazione immunomagnetica, si cerca di facilitare il recupero delle poche cellule eventualmente presenti nel campione di sangue periferico.

Un ostacolo che ha reso difficile la messa a punto di tecniche affidabili per l'identificazione delle cellule tumorali circolanti, è rappresentato dal fatto che queste cellule non presentano "antigeni specifici" utilizzabili nella messa a punto dei sistemi di rilevazione; questo comporta l'utilizzo di marcatori epiteliali o marcatori espressi più frequentemente dalle cellule tumorali, non sempre riscontrabili data l'eterogeneità della popolazione neoplastica. I metodi basati sulla rilevazione tramite PCR (in genere RT-PCR) di particolari geni, prevedono una iniziale separazione delle cellule mononucleate presenti nel campione, quindi una estra-

zione dell'RNA e una trascrizione inversa, in modo da trascrivere le sequenze di interesse in cDNA. Il cDNA viene quindi amplificato con primers specifici per i trascritti di interesse, che nel caso dei tumori della mammella sono rappresentati o da marker tessuto specifici (citocheratine, MUC-1, EGFR), o antigeni oncofetal (come la beta-HCG). Questo approccio ha il vantaggio di una elevata sensibilità; i limiti sono rappresentati dalla difficoltà nella scelta dei geni da valutare, dalla possibilità di ottenere dei falsi positivi dovuti alla mancanza di geni tumore-specifici, (e quindi la necessità di usare due o più geni e di settare delle soglie), e dalla scarsa riproducibilità. Inoltre, questa metodica determina la distruzione delle cellule quindi rende impossibile effettuare un conteggio.

Per quanto riguarda i metodi citofluorimetrici, essi sono basati sulla identificazione delle cellule epiteliali circolanti mediante l'impiego di anticorpi monoclonali diretti verso diversi antigeni epitelio-specifici, in genere citocheratine. Diversi studi hanno dimostrato la natura maligna delle cellule circolanti che esprimono markers epiteliali, e che queste cellule possiedono le medesime caratteristiche biologiche del tumore d'origine dal quale, quindi, vengono rilasciate in circolo. Di recente introduzione è una nuova tecnologia (CellSearch, Veridex LLC, Warren, NJ), che si basa sull'arricchimento immunomagnetico del campione di sangue periferico per mezzo di particelle di ferro rivestite dall'anticorpo anti-EpCAM (Epithelial-cell Adhesion Molecule) che è in grado di catturare le cellule. Il campione viene poi incubato in un campo immunomagnetico, sottoposto a diversi lavaggi, quindi le cellule vengono colorate con un colorante per gli acidi nucleici (DAPI) e con un anticorpo anticitocheratine 8, 18 e 19, entrambe coniugati con coloranti fluorescenti. Per evitare la contaminazione con leucociti viene aggiunto anche un anticorpo anti-CD45, in modo da poter escludere dalla conta i globuli bianchi. Il campione finale viene dispensato all'interno di un capillare che si trova in una cartuccia con un campo magnetico studiato in maniera da favorire il posizionamento delle cellule sulla superficie, in modo da poter essere poi letto tramite un microscopio a fluorescenza dedicato e automatizzato: il risultato della scansione viene poi proiettato su uno schermo di un computer dove un operatore opportunamente addestrato potrà riconoscere le cellule tumorali presenti. Il sistema ha dimostrato di essere affidabile e standardizzato: uno studio ha valutato sia la ripetibilità di campioni di controllo contenenti un pre-definito numero di cellule, inviati a diversi laboratori, sia la stabilità dei campioni, sia la variabilità inter-strumento, sia la concordanza tra campioni positivi prelevati da donne con tumore della mammella metastatico. I risultati hanno confermato l'affidabilità della tecnologia, rendendola utilizzabile in routine e in laboratori diversi.

Come per altri marcatori tumorali, le CTC potrebbero essere di ausilio nelle diverse fasi della malattia, permettendo la valutazione della prognosi sia nella malattia in fase iniziale, che nella fase avanzata. Le CTC potrebbero inoltre essere utili per predire la risposta a determinate terapie, o infine nel follow-up di donne libere da malattia, permettendo la rilevazione precoce della recidiva. Un utilizzo importante delle CTC potrebbe essere anche nella valutazione del rischio di sviluppare una malattia neoplastica e nello screening anche se ad oggi nessun test per la rilevazione della presenza delle CTC ha dimostrato una sensibilità o

specificità sufficienti per poter essere utilizzato come test di rischio o test di screening, o per distinguere una lesione benigna da una maligna o un tumore da un altro. Invece vi sono oramai molti lavori pubblicati che suggeriscono che le CTC possono fornire informazioni molto utili in pazienti con nuova diagnosi di carcinoma mammario o in quelle monitorate per la ripresa della malattia, o durante il trattamento della malattia in fase avanzata.

Il primo studio è stato effettuato su 177 donne con tumore avanzato della mammella, nelle quali la ricerca delle CTC è stata effettuata prima dell'inizio della chemioterapia e al primo follow-up (dopo un ciclo di terapia). Questo studio ha documentato che la presenza di 5 o più cellule in 7.5 ml di sangue rilevata nel 50% delle pazienti, era associata ad una prognosi peggiore, con un tempo alla progressione inferiore a tre mesi e una sopravvivenza di 10 mesi ($p < 0.001$) rispetto alla donne nelle quali il numero di CTC al primo prelievo era < 5 che presentavano un tempo alla progressione di 7 mesi e una sopravvivenza superiore a 18 mesi ($p < 0.001$). Sulla base di questi risultati l'FDA ha approvato l'utilizzo della metodica di rilevazione delle CTC con il sistema CellSearch nelle pazienti con tumore della mammella avanzato. Questi risultati sono stati successivamente confermati anche in altri studi, nei quali le CTC hanno fornito indicazioni più precise sullo stadio di malattia rispetto alle tecniche standard di imaging. Un dato molto importante è rappresentato inoltre dal riscontro che elevati valori di CTC in un prelievo effettuato in qualsiasi momento durante la chemioterapia era associato a ripresa di malattia, suggerendo quindi che la valutazione delle CTC rappresenta un indicatore accurato dello stato della malattia, e forse potrebbe essere utilizzato per modificare precocemente il trattamento in pazienti non responsive. Proprio tenendo conto di questi risultati è stato disegnato negli Stati Uniti uno studio nel quale donne con malattia metastatica vengono testate per la presenza di CTC prima dell'inizio di chemioterapia. Nelle pazienti con un numero di CTC ≥ 5 , viene effettuata una seconda valutazione dopo 3 settimane dall'inizio del trattamento. Le pazienti con un numero di CTC ≥ 5 vengono randomizzate a 1) continuare la stessa terapia, oppure 2) ad un passaggio a terapia diversa. L'obiettivo di questo studio (che ha come obiettivi primari la sopravvivenza globale e la sopravvivenza libera da progressione) è quello di verificare se le CTC possano precocemente indicare che la paziente non sta rispondendo alla terapia, permettendo quindi una pianificazione di un nuovo trattamento potenzialmente efficace.

Un altro importante aspetto è rappresentato dalla possibilità di caratterizzare biologicamente le cellule tumorali circolanti. Ad oggi infatti le decisioni terapeutiche vengono prese, oltre che su valutazioni cliniche, anche sulla base delle caratteristiche biologiche determinate sul tumore primitivo al tempo dell'intervento chirurgico, quindi spesso anni prima. Tuttavia vi sono oramai parecchi dati in letteratura che dimostrano che la biologia della malattia metastatica può essere diversa dalla biologia della malattia primaria, in termini di espressione dei recettori ormonali o di iperespressione di HER-2/neu; inoltre le CTC potrebbero essere caratterizzate per quel che riguarda il loro potenziale di staminalità. Numerosi marcatori sono stati proposti per identificare la cellula tumorale staminale, e questi potrebbero essere testati sulle CTC, in quanto il loro riscontro potrebbe giusti-

ficare la resistenza alle chemioterapie tradizionali e orientare verso forme di trattamento a bersaglio più specifico. Un'ulteriore applicazione potrebbe utilizzare le CTC per testare in vitro l'efficacia di farmaci, prima della loro somministrazione nei pazienti.

Se nella malattia avanzata i risultati disponibili sono abbastanza consolidati, qualche difficoltà esiste invece nella valutazione del ruolo delle CTC nella malattia localizzata. La terapia adiuvante sistemica, includendo terapia endocrina, immunoterapia anti-HER2 e chemioterapia standard, ha ridotto la mortalità per tumore alla mammella. Questi trattamenti tuttavia non sono esenti da effetti collaterali. Pertanto sarebbe importante poter individuare quelle pazienti, a buona prognosi, che non necessitano della terapia. Diversi studi hanno valutato l'impatto del riscontro di CTC in queste pazienti.

Utilizzando la tecnologia real time RT-PCR, il riscontro di CTC prima dell'inizio delle chemioterapia adiuvante (chemioterapia +/- ormonoterapia) si è dimostrato essere il fattore prognostico più importante (in termini di sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale), e la presenza di CTC positive per HER-2 mRNA in pazienti con malattia allo stadio I-II, dopo la somministrazione di chemioterapia, è risultata essere un fattore prognostico negativo, in termini di sopravvivenza libera da malattia. Questi ed altri studi forniscono l'evidenza che la presenza di CTC, rilevate mediante metodi molecolari, in pazienti con malattia localizzata trattate con terapia adiuvante, e valutate prima della somministrazione o al termine del trattamento, rappresenta un fattore prognostico sfavorevole, indipendente anche dallo stato linfonodale.

Ancora pochi dati invece sono disponibili per quel che riguarda il valore della determinazione delle CTC con il sistema CellSearch. In Germania è in corso uno studio (SUCCESS) il cui obiettivo è di verificare se il riscontro di CTC prima dell'inizio, durante e dopo il termine della somministrazione della chemioterapia adiuvante può essere di ausilio per la stratificazione del rischio di ripresa di malattia e il monitoraggio dell'efficacia del trattamento. I dati disponibili fino ad ora indicano che la presenza di CTC al termine della terapia sembra essere significativamente associata ad una riduzione di sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale.

In conclusione si può dire che la determinazione quantitativa delle CTC rappresenta solo la punta dell'iceberg, in quanto è sicuramente molto più vasto il contributo che la loro caratterizzazione può fornire per quanto riguarda la comprensione di fenomeni biologici e clinici della malattia. Numerosi studi hanno valutato la possibilità di fenotipizzare o genotipizzare le cellule isolate per una varietà di marcatori tumore-associati come HER-2, IGFR1, BCL-2, telomerasi, Notch1 e, nei tumori prostatici, sembra essere fattibile il "gene expression profiling". Non ci sono ancora studi che abbiano riportato come queste conoscenze possano poi trovare una applicazione clinica, ma sicuramente il loro potenziale è molto elevato. Nei prossimi anni probabilmente la valutazione delle CTC e la loro caratterizzazione entreranno a far parte degli strumenti utilizzati per una gestione migliore e personalizzata delle donne con tumore della mammella.

Bibliografia essenziale

1. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351: 781-791.
2. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 6403-6409.
3. Nolè F, Munzone E, Zorzino L, et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol.* 2008; 19: 891-897.
4. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 3756-3762.
5. Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, et al. Different Prognostic Value of Cytokeratin-19 mRNA-Positive Circulating Tumor Cells According to Estrogen Receptor and HER2 Status in Early-Stage Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 5194-5202.
6. Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, et al. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann Oncol.* 2007; 18: 851-858.
7. Lang J.E, Mosalpuria K, Cristofanilli M, et al. HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 113: 501-507.
8. Biggers B, Knox S, Grant M, et al. Circulating tumor cells in patients undergoing surgery for primary breast cancer: preliminary results of a pilot study. *Ann Surg Oncol.* 2009; 16: 969-971.
9. Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 4993-4997.
10. Pantel K, Brakenhoof RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Rev.* 2008; 8: 329-340.

Profilo di espressione genica e predizione della sopravvivenza nel tumore della mammella

Alberto Zambelli

Divisione di Oncologia 1, Fondazione Salvatore Maugeri, Pavia

Nel mondo Occidentale il carcinoma mammario (BC) rappresenta la più frequente forma di neoplasia della popolazione femminile e costituisce il 30% di tutte le diagnosi di cancro e il 16% di morte per tutte le forme di neoplasia.

Diversi fattori clinici e patologici sono stati valutati negli anni al fine di identificare fattori predittivi di sopravvivenza e di risposta alle cure. Tra questi sono degni di menzione l'età, lo stato menopausale, le dimensioni tumorali, il grading tumorale, l'espressione dei recettori ormonali e di ERBB2.

Molti di questi fattori sono stati combinati in modelli di predizione come il Nottingham Prognostic Index (NPI) e Adjuvant!online o sono stati inclusi in algoritmi utilizzati per lo sviluppo di linee guida per il trattamento, come nel caso delle raccomandazioni proposte nel "consensus meeting" di esperti, noto come consenso di St Gallo.

Tuttavia, gli indicatori di prognosi ad oggi disponibili hanno una limitata capacità di predire l'esito clinico individuale di ciascun singolo paziente. Inoltre questi fattori prognostici non permettono di predire la risposta alla terapia medica adiuvante e non sempre sono determinanti nella decisione clinica riguardo al tipo di terapia da applicare.

La tecnologia basata sul cDNA microarray ha fornito ai medici e ricercatori la straordinaria opportunità di approfondire i profili molecolari e genetici del carcinoma mammario. Infatti la possibilità di analizzare in modo simultaneo migliaia di geni ha trasformato la metodica del cDNA microarray in uno strumento non solo adatto per gli studi di biologia molecolare ma anche per gli studi di correlazione tra profili molecolari e decorso di malattia, fornendo di fatto un innovativo punto di osservazione per la classificazione delle neoplasie.

Lo studio dei profili genici è pronto per essere applicato nella pratica clinica?

L'iniziale entusiasmo dei ricercatori per l'applicazione della tecnologia cDNA microarray è stato raffreddato da una serie di pubblicazioni scientifiche che

hanno riportato risultati contraddittori nell'analisi dello stesso RNA in differenti piattaforme di microarray, facendo crescere un certo scetticismo riguardo l'attendibilità e la riproducibilità della metodica. In realtà molti di questi risultati apparentemente divergenti sono spiegati dalla complessa natura della tecnologia utilizzata e dai metodi analitici impiegati senza tuttavia che questo significhi che la metodica non sia affidabile.

Proprio in considerazione delle enormi potenzialità della tecnologia microarray e dei forti dubbi emersi dai primi lavori di confronto, la FDA ha lanciato il progetto di Controllo di Qualità dei Microarray (MAQC) con l'obiettivo di verificare l'affidabilità e la riproducibilità dei dati ottenuti tra i laboratori differenti e tra differenti piattaforme di microarray. I risultati ottenuti da questo sforzo hanno permesso di definire gli standard analitici e hanno permesso di evidenziare come la tecnologia dei microarray sia altamente riproducibile e attendibile tanto da essere candidabile per l'applicazione clinica.

Tuttavia il passaggio alla clinica è stato ragionevolmente prudente dal momento che anche per la validazione dei profili genici di prognosi e predizione di risposta alla terapia sono emersi differenti "classificatori" di espressione genica per medesime neoplasie con rare evidenze di geni ricorrenti. Anche in questo caso le successive analisi e revisioni dei processi analitici hanno permesso di ri-collocare queste apparenti discrepanze nell'alveo delle ragioni analitiche. In particolare appare chiaro che diversi gruppi di geni sono fortemente correlati tra loro e che possono essere associati con l'outcome clinico. Poiché la forza della correlazione tra espressione genica e outcome clinico varia a seconda dei diversi training set genici, anche la possibilità di ordinare per importanza i diversi geni e le informazioni prognostiche ad essi correlate è variabile e si accompagna alla possibilità di avere liste di geni con scarse sovrapposizioni.

Nonostante queste differenze la maggior parte dei classificatori molecolari mostra un significativo livello di concordanza nella predizione del decorso clinico della malattia. Questo è stato elegantemente dimostrato da un gruppo di ricercatori americani che nel caso del carcinoma mammario ha applicato 5 differenti classificatori genici con scarsa sovrapposizione di geni e ha ottenuto che su 5 predittori 4 presentavano lo stesso valore prognostico. Infine lo stesso gruppo che aveva lanciato il MAQC ha proposto il MAQC fase 2 con l'obiettivo di standardizzare la procedure per la definizione e validazione dei classificatori genici per la prognosi di malattia e la predizione di risposta alle cure.

Profili di espressione genica e prognosi

Negli ultimi anni diversi gruppi di ricerca hanno condotto studi volti a identificare nel caso del carcinoma mammario profili di espressione genica a scopo prognostico, per migliorare i tradizionali marcatori di prognosi. Due differenti approcci metodologici sono stati utilizzati:

1. Top-down: in questo caso il modello prognostico si ottiene semplicemente correlando i dati di espressione genica con il decorso della malattia senza alcuna ipotesi biologica a priori.

2. Bottom up: in questo caso si identifica un gruppo di geni associati ad uno specifico aspetto biologico, e se ne correla il risultato con il decorso clinico della malattia sulla base di un'ipotesi biologica formulata a priori.

Utilizzando l'approccio definito top-down un gruppo di ricercatori di Amsterdam ha definito un profilo genico di 70 geni (Mammaprint, tecnologia Agilent) in grado di fornire robuste indicazioni prognostiche su pazienti affette da carcinoma mammario operato con età <55 aa.

Con lo stesso approccio un gruppo di ricercatori di Rotterdam ha identificato un profilo genico di 76-geni (tecnologia Affimetrix) con una capacità prognostica per il decorso clinico del carcinoma mammario simile a quella del Mammaprint. La principale differenza tra i 2 classificatori genici è rappresentata dal tipo di piattaforma per microarray utilizzata.

Tuttavia la sfida maggiore per gli studi di espressione genica, soprattutto per quelli con implicazioni cliniche, è rappresentata dalla validazione dei risultati su data set indipendenti. In quest'ambito, un gruppo di ricerca transazionale (TRANSBIG) ha condotto uno studio di validazione indipendente di entrambi i profili genici di Amsterdam e Rotterdam, e nonostante ci fossero solo 3 geni uguali nei 2 profili, entrambi sono stati validati come indicatori prognostici efficaci nello stesso gruppo di pazienti con carcinoma mammario operato. Entrambi i profili genici sono risultati all'altezza del miglior programma validato di valutazione del rischio clinico di recidiva (Adjuvant!Online), mostrando un'alta sensibilità, e cioè una bassa probabilità di falsi positivi nel gruppo di pazienti a basso rischio di recidiva e anche una alta specificità, il che significa una bassa probabilità di falsi positivi nel gruppo ad alto rischio di recidiva. In pratica entrambi i profili genici sono risultati superiori, rispetto ai predittori tradizionali, nella corretta identificazione delle pazienti a basso rischio di recidiva ponendo quindi le basi per una potenziale riduzione delle terapie sistemiche nel carcinoma mammario precoce.

Un altro punto di discussione per la validazione di questi profili genici è l'eterogeneo comportamento di entrambi i profili, nel follow-up a lungo termine (14 anni di follow-up); infatti entrambi sono risultati ottimi predittori per l'identificazione di soggetti a rischio di sviluppo di metastasi a distanza nei primi 5 anni di follow-up, ma il loro valore prognostico decresce con l'aumentare degli anni di controllo. Questa evidenza non del tutto inaspettata, dal momento che questi profili erano stati identificati per valutare il rischio di recidiva nei primi 5 anni di follow-up; tale dato suggerisce che probabilmente esistono differenti meccanismi molecolari di metastatizzazione precoce e tardiva.

Diversamente rispetto agli studi molecolari di tipo "top-down", l'approccio definito "bottom-up" dei ricercatori dell'Università di Stanford partiva da una specifica ipotesi biologica e cioè che i meccanismi fisiologici di riparazione ad un insulto (e i geni implicati in questo meccanismo) potessero essere associati con la progressione tumorale e con i tassi di sopravvivenza delle pazienti. I ricercatori di Stanford hanno infatti potuto identificare un profilo genico di risposta agli insulti caratteristico e hanno dimostrato che le pazienti affette da carcinoma mammario, che esprimevano questo tipo profilo presentavano un decorso della malattia peggiore rispetto a che non era portatore di tale profilo.

Un altro gruppo di ricercatori ha utilizzato un approccio simile a quello di Stanford, ricercando il pattern di espressione genica associato con il grado istologico della neoplasia, allo scopo di migliorare il valore prognostico della classificazione del carcinoma mammario secondo il grading tumorale. Il razionale di questo studio era l'assunzione che i tumori a basso ed alto grado di differenziazione si comportassero come malattie differenti. Inoltre bisogna sottolineare che i tumori a grado intermedio, che rappresentano il 30-60% di tutti i casi, sono la maggior fonte di discrepanza fra i patologi e rappresentano inoltre un gruppo di pazienti in cui sono frequenti le discordanze nelle decisioni terapeutiche oncologiche. Sulla base di queste problematiche è stato sviluppato un indice di espressione genica del grado tumorale (GGI), basato su 97 geni, la cui espressione varia in base al grading tumorale. Sorprendentemente è stato scoperto che non esiste un pattern di espressione genica distinto associato con il grado intermedio, ma che i geni espressi sono gli stessi dei bassi ed alti gradi; pertanto è possibile classificare in due gruppi in base alle caratteristiche dei geni coinvolti nei meccanismi di proliferazione cellulare come a basso od alto rischio, risolvendo l'indeterminatezza del grado intermedio. Questi risultati sono stati confermati da studi di validazione su data set indipendenti e confrontati in piattaforme microarray differenti dimostrando affidabilità e riproducibilità nella definizione del genomic-grade. In analisi eseguite in pazienti affette da carcinoma mammario ER positivo il GGI si è rivelato essere uno dei più importanti predittori dell'outcome clinico, rispetto ad altri fattori di prognosi sottolineando l'importanza dei geni di proliferazione in questo sottogruppo di pazienti. Alla luce di questa e di altre simili evidenze si comprende come l'indice di proliferazione sia uno dei 5 componenti fondamentali dell'OncotypeDX Recurrence Score (RT-PCR), un indice che integra l'analisi di gruppi di geni implicati nella biologia tumorale allo scopo di ottenere indicazione di prognosi. Il fatto che putative cellule staminali del cancro possano essere coinvolte più di altre nei meccanismi di progressione della malattia e di metastasi ha spinto i ricercatori ad indagare il profilo genico di queste cellule per verificare se è possibile descriverne le caratteristiche molecolari definendo un profilo genico di tipo "staminale". Le evidenze di questi studi hanno permesso di distinguere cellule staminali con caratteri di più o meno spiccati di self-renewal e associati a differenti esiti prognostici. Ancora una volta è stato osservato che i geni implicati in questi profili sono relativi al ciclo cellulare, alle mitosi e all'apoptosi. Per finire, i profili genici sono stati applicati con successo anche nel tentativo di distinguere il tipo di tumore in base alle sedi preferenziali di metastasi. Benché questi tipi di profili di predizione non aggiungano informazioni rispetto ai profili di prognosi tradizionalmente utilizzati, tuttavia permettono di approfondire i meccanismi molecolari che guidano le progressione e la localizzazione organo-specifica delle metastasi.

Profili di espressione genica e predizione di risposta alla terapia

La possibilità di identificare profili di espressione genica in grado di definire prognosi sempre più individualizzate non è ancora sufficiente per poter individualiz-

zare la terapia per ciascun singolo paziente e incidere realmente nella storia clinica favorendo decorsi di malattia migliori.

A tale proposito una serie di studi di farmaco-genomica sono stati intrapresi con l'obiettivo di identificare predittori molecolari di risposta a ciascun singolo farmaco o combinazione farmacologica.

Attualmente solo 2 predittori sono riconosciuti nella pratica clinica della cura del carcinoma mammario con terapia ormonale e con trastuzumab: rispettivamente i recettori ormonali e il recettore ERBB2. Questi predittori ottengono un eccellente valore predittivo negativo ma un sub-ottimale valore predittivo positivo. Con lo scopo di migliorare le performance dei classificatori molecolari di predizione sono stati realizzati una serie di studi che hanno identificato per ciascun trattamento ormonale e/o chemioterapico un differente e specifico profilo di espressione genica in grado di predire la risposta alla terapia. Numerosi studi hanno indagato le correlazioni tra caratteri molecolari tumorali e responsività ai trattamenti medici, in molti casi ottenendo suggestive indicazioni per una terapia guidata dai profili di espressione genica. Tra questi anche il nostro gruppo ha contribuito ad identificare un profilo di risposta alla terapia ormonale con anastrozolo in pazienti affette da carcinoma mammario ER pos in menopausa.

Tuttavia, nonostante gli sforzi applicati in tale campo, i risultati conseguiti rimangono ancora insoddisfacenti e diverse criticità emergono nella revisione dei risultati riportati in tali lavori. In particolare la robustezza dei dati viene messa in dubbio per la frequente scarsa numerosità campionaria degli studi e la debolezza statistica che si accompagna è spesso aggravata da discrepanze relative ai diversi regimi di terapia, alla popolazione selezionata e all'eterogeneità degli end-points di volta in volta identificati. Tutte queste (ed altre considerazioni) hanno fortemente limitato l'indicazione per la pratica clinica alla scelta terapeutica guidata dalle sole caratteristiche molecolari della malattia. In tale senso un punto cruciale è rappresentato dalla necessità che i predittori molecolari candidati vengano validati su casistiche indipendenti, solo allora potrà essere attribuito un qualche significato clinico alle evidenze analitiche, passando dalla generazione di ipotesi alla verifica scientifica.

Prospettive future

Quando dunque un profilo di espressione genica diventa importante per la pratica clinica?

La necessità di validare le varie piattaforme microarray su data set indipendenti e la necessaria ricerca di affidabilità e riproducibilità dei dati hanno sino ad oggi permesso a solo 2 profili di espressione genica di essere considerati per la pratica clinica: OncotypeDx RS (USA) e di MammaPrint (Amsterdam-Europa).

Due ampi studi prospettici sono infatti stati lanciati rispettivamente dall'Europa (MINDACT) e dagli Stati Uniti (TAILORx) con lo scopo di valutare in modo prospettico l'efficacia prognostica e predittiva dei due profili di espressione genica. Con il primo studio (MINDACT) si intende validare il profilo di espressione genica di Amsterdam come strumento per meglio identificare pazienti affette da

carcinoma mammario a buona prognosi che possono evitare di ricevere chemioterapia. Con lo studio TAILORx si intende validare il profilo genico OncotypeDx in modo da testarne la capacità di selezionare pazienti che possono ricevere sola terapia ormonale rispetto al trattamento combinato ormonale e chemioterapico. Questi due trials forniranno un livello 1 di evidenza circa la rilevanza clinica dell'applicazione dei profili di espressione genica quali predittori di prognosi e risposta alla terapia.

Nella prospettiva della medicina molecolare appare sempre più chiaro che l'affinamento delle procedure analitiche consentirà di utilizzare strumenti nuovi per strategie di cura sempre più personalizzate e indirizzate verso bersagli cellulari e molecolari ben definiti. L'orizzonte è quello di una rinnovata alleanza fra i ricercatori e medici che possa essere in grado di tradurre nella pratica clinica le enormi potenzialità che la tecnologia e la ricerca di base sono in grado di produrre a favore della cura dei pazienti.

Bibliografia

1. Feuer EJ, et al. The lifetime risk of developing breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85: 892-897.
2. Goldhirsch A, et al. First select the target: better choice of adjuvant treatments for breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2006; 17: 1772-1776.
3. Shi L, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nature Biotechnol.* 2006; 24: 1151-1161.
4. Kothapalli R, Yoder SJ, Mane S, Loughran TP Jr. Microarray results: how accurate are they? *BMC Bioinformatics.* 2002; 3: 22.
5. Baum M, et al. Validation of a novel, fully integrated and flexible microarray benchtop facility for gene expression profiling. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: e151.
6. Hardiman G. Microarrays technologies 2006: an overview. *Pharmacogenomics.* 2006; 7: 1153-1158.
7. Layfield LJ, Goldstein N, Perkinson KR, Proia AD. Interlaboratory variation in results from immunohistochemical assessment of estrogen receptor status. *Breast J.* 2003; 9: 257-259.
8. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol.* 2000; 53: 125-130.
9. Dupuy A, Simon RM. Critical review of published microarray studies for cancer outcome and guidelines on statistical analysis and reporting. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 147-157.
10. Fan C, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med.* 2006; 355: 560-569.
11. Naderi A, et al. A gene-expression signature to predict survival in breast cancer across independent data sets. *Oncogene.* 2006; 26: 1507-1516.

12. van't Veer LJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415: 530-536.
13. Wang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*. 2005; 365: 671-679.
14. van de Vijver MJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1999-2009.
15. Foekens JA, et al. Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 1665-1671.
16. Buyse M, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98: 1183-1192.
17. Desmedt C, et al. Strong time-dependency of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multi-centre independent validation series. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 3207-3214.
18. Paik S, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2817-2826.
19. Ivshina AV, et al. Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. *Cancer Res*. 2006; 66: 10292-10301.
20. Desmedt C, Sotiriou C. Proliferation: the most prominent predictor of clinical outcome in breast cancer. *Cell Cycle*. 2006; 5: 2198-2202.
21. Miller LD, et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 13550-13555.
22. Liu R, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med*. 2007; 356: 217-226.
23. Minn AJ, et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest*. 2005; 115: 44-55.
24. Minn AJ, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005; 436: 518-524.
25. Jansen MP, et al. Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 732-740.
26. Folgueira MA, et al. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 7434-7443.
27. Mello-Grand M, Singh V, Ghimenti C, Scatolini M, Regolo L, Grosso E, Zambelli A, et al. Gene expression profiling and prediction of response to hormonal neoadjuvant treatment with anastrozole in surgically resectable breast cancer (submitted breast can res and treat 2010).
28. Chang JC, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet*. 2003; 362: 362-369.
29. Bertucci F, et al. Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. *Cancer Res*. 2004; 64: 8558-8565.
30. Rouzier R, et al. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 8315-8320.

Cellule staminali tumorali: nuovi bersagli terapeutici per la cura del cancro

Giorgio Stassi

Oncologia Sperimentale, Fondazione Salvatore Maugeri, Pavia

Sempre più dati sia sperimentali che clinici sono a sostegno dell'ipotesi che il tumore, considerato come un processo morfogenetico aberrante, possa avere origine in seguito a mutazioni genetiche a carico delle cellule staminali. Infatti le cellule staminali, a differenza delle cellule terminalmente differenziate, sebbene dividano lentamente sono caratterizzate da un potenziale proliferativo illimitato; per tal motivo sono maggiormente esposte ad agenti mutageni e possono accumulare mutazioni, in seguito trasmesse alla progenie cellulare, favorendo il processo di carcinogenesi. Inoltre, numerosi *pathways* cellulari implicati nel mantenimento dell'omeostasi delle cellule staminali e nel corretto svolgimento di programmi morfogenetici, sono spesso deregolati nei tumori.

La caratteristica principale delle cellule staminali è la loro capacità di autorinnovarsi e di dare origine ad una progenie di cellule differenziate. Questo potenziale unico di autorinnovamento è alla base del mantenimento dei tessuti in condizioni fisiologiche ed alla loro riparazione in seguito a un danno, consentendo di generare l'intero repertorio cellulare specifico di ciascun tessuto. L'autorinnovamento e il differenziamento sono relativi alla capacità delle cellule staminali di dividersi in modo asimmetrico, cioè ad ogni divisione cellulare sono in grado di dare origine sia a cellule pluripotenti (del tipo staminale) che commissionate (differenziate o specializzate) in un modo finemente regolato. La deregolazione di tali meccanismi può causare un'aberrante crescita morfogenetica con conseguente formazione e sostenimento di un tumore. Inoltre, recenti dati sperimentali indicano che il fallimento di terapie standard e le recidive dei tumori sono conseguenze dirette dell'elevata resistenza delle cellule staminali tumorali ai trattamenti terapeutici convenzionali. Diversi sono i meccanismi coinvolti nella refrattarietà di queste cellule, quali una elevata espressione di proteine appartenenti alla famiglia dei trasportatori di membrana ABC (che favoriscono l'efflusso cellulare di farmaci e sono coinvolti nella resistenza), alterazioni nei meccanismi di riparazione del DNA, la presenza di fattori citoprotettivi, quali attivazione di telomerasi ed elevata espressione di fattori anti-apoptotici, e una relativamente modesta velocità di crescita a fronte di un elevato potenziale proliferativo.

Le cellule staminali tumorali (CST) sono state identificate originariamente nelle leucemie acute e successivamente nel carcinoma mammario e nei tumori cerebrali. Il primo lavoro riportante un'organizzazione gerarchica all'interno di un tumore risale alla fine degli anni '90, quando Bonnet e Dick isolarono una sottopopolazione di cellule leucemiche con caratteristiche di staminalità. Questa popolazione, caratterizzata dall'espressione del marcatore di superficie CD34, ma non di quella dell'antigene CD38, era in grado di ricostituire la malattia se inoculata in topi immunocompromessi (NOD/SCID) al contrario delle sottopopolazioni CD34+/CD38+ e CD34-.

Nei tumori solidi tuttavia, l'identificazione delle CST si è rivelata più complicata. A differenza del sistema emopoietico infatti, una organizzazione tissutale gerarchica non è sempre evidente ed i sistemi di isolamento sono spesso inefficienti ed influiscono notevolmente sulla vitalità cellulare.

La prima identificazione delle CST all'interno di un tumore solido risale al 2003. Al-Hajj e collaboratori dimostrarono che l'inoculo di 200 cellule CD44+/CD24-/linlow/- nel fat pad di topi NOD/SCID generava tumori mammari, che riproducono fenotipicamente il tumore d'origine.

Con l'individuazione delle staminali tumorali, il fenomeno cancro non viene più visto quindi come un accumulo casuale di mutazioni in una cellula somatica, quanto un aberrante e poco regolato processo di organogenesi rispetto al fisiologico programma delle cellule staminali normali. Questa nuova concezione possiede considerevoli implicazioni teorico-pratiche. Infatti, nonostante i notevoli progressi diagnostici e terapeutici ottenuti negli ultimi anni, la mortalità nella patologia neoplastica rimane elevata per l'incapacità delle attuali terapie di impedire l'emersione di cloni cellulari resistenti ai trattamenti chemioterapici. Il principale target terapeutico oggi è rappresentato dalle cellule differenziate ed in attiva proliferazione, che costituiscono la maggioranza della massa tumorale; in questo modo la terapia risulta spesso apparentemente capace di eradicare il tumore, ma la mancata eliminazione delle CST - numericamente esigue, meno differenziate, capaci di escludere sostanze esogene, protette dai meccanismi di morte programmata e perlopiù quiescenti - determina un elevato rischio di recidive anche dopo prolungati periodi di remissione. Risulta chiaro che un approccio terapeutico selettivamente mirato sulle staminali tumorali risulterebbe di gran lunga più efficace, impedendo la rigenerazione del tumore. Le CST rappresentano attualmente forse il più promettente materiale di studio per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche mirate all'eradicazione della quota di cellule neoplastiche responsabili del mantenimento e della crescita del tumore.

Date tali premesse, è facilmente intuibile il beneficio che si otterrebbe dalla caratterizzazione funzionale e molecolare delle CST e dall'analisi del loro spettro di sensibilità ai farmaci, sia per la diagnosi che per il monitoraggio e la cura dei tumori, migliorandone sia la specificità che l'efficacia a lungo termine.

Inoltre, se le CST sono le uniche cellule responsabili della crescita tumorale, allora solo la disseminazione di rare CST dotate di attività migratoria determinerebbe la formazione delle metastasi. Pertanto la disponibilità di marker specifici per l'identificazione delle CST con capacità migratoria, potrebbe consentire una dia-

gnosi precoce e l'individuazione rapida dei linfonodi che ospitano cellule tumorigeniche, durante la fase di asportazione chirurgica. Ciò comporterebbe un grosso beneficio diagnostico e terapeutico. Tuttavia, le CST non sono ancora state sufficientemente studiate a livello molecolare. Sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere i meccanismi genetici e biochimici che ne regolano l'autorinnovamento, il mantenimento dello stato indifferenziato e la capacità invasiva e metastatica.

Cellule staminali del colon-retto

Il colon è un organo altamente strutturato la cui unità funzionale è costituita dalla cripta. Oggi, è ampiamente accettato che il turn-over delle cellule del colon è reso possibile grazie alla presenza di cellule staminali multipotenti localizzate alla base di ogni cripta. In particolare, da quattro a sei cellule staminali si dividono asimmetricamente, per poi migrare verso l'alto, e differenziarsi nei tre tipi di cellule epiteliali: enterociti, cellule goblet e cellule entero-endocrine.

Le cellule staminali del colon possono essere individuate attraverso l'espressione di marcatori specifici. La proteina Musashi 1 (Msi-1), è stata proposta come il primo marcatore delle cellule staminali del colon. Msi-1 è un RNA-binding protein inizialmente identificata in *Drosophila melanogaster*, dove svolge un ruolo essenziale nelle divisioni asimmetriche dei progenitori delle cellule sensoriali (21). Msi-1 è in grado di reprimere mRNA della proteina Numb, un regolatore positivo del pathway di Notch. Le cellule Msi-1 positive sono state identificate nei due terzi inferiori della cripta del colon corrispondente al compartimento proliferante. Più recentemente, un altro gruppo di ricerca ha proposto la proteina Lgr5 come marcatore di staminalità nell'intestino tenue.

Il rapido tasso di turnover delle cellule del colon rende le CST a rischio di incorrere nell'accumulo di mutazioni somatiche.

Recentemente, due diversi gruppi di ricerca hanno proposto l'antigene CD133 come marcatore di staminalità per i tumori del colon-retto. CD133, noto anche come Prominin-1, è una glicoproteina transmembrana precedentemente identificata come marcatore di staminali neurali normali e di cellule della linea emopoietica, epiteliale ed endoteliale, coinvolta nell'organizzazione della topologia di membrana plasmatica.

Le cellule CD133+ del colon rappresentano circa il 2,5% della massa tumorale, e non esprimono marcatori di differenziamento epiteliale quali la citocheratina 20 (CK20), pur esprimendo l'antigene epiteliale BerEP4 (EpCAM).

Il trapianto della sottopopolazione CD133+, ma non di quella CD133- in topi NOD/SCID è sufficiente per indurre la crescita di un tumore che riproduce lo stesso profilo morfologico e antigenico del tumore umano parentale.

Le cellule CD133+ ottenute direttamente dalla dissociazione di campioni tumorali, possono essere perpetuate in opportune condizioni colturali sotto forma di aggregati flottanti chiamati "sfere", le quali mantengono lo stato indifferenziato e la capacità tumorigenica quando iniettate in topi NOD/SCID. In assenza di opportuni fattori di crescita, le sfere possono essere indotte a differenziare, acqui-

sendo la morfologia poligonale tipica delle cellule epiteliali e l'espressione di marcatori di differenziamento, come la CK20. Contemporaneamente si assiste alla perdita dell'espressione di CD133 e della capacità tumorigenica.

Recentemente, Dalerba e collaboratori hanno proposto la glicoproteina di superficie CD44 come nuovo marcatore di CST del colon-retto.

CD44 è una proteina transmembrana monomeric, altamente glicosilata la cui funzione principale è quella di legare l'acido ialuronico ed altre glicoproteine della matrice extracellulare. CD44 è coinvolta in diversi processi biologici tra cui la crescita del tumore e la formazione delle metastasi in svariati modelli. Tuttavia la sua reale utilità nell'identificazione delle CST del colon appare dubbia per la sua funzione strutturale e per la sua presenza pressoché ubiquitaria in numerosi tessuti. Dati preliminari indicano che la capacità di dare origine a metastasi è limitata ad una piccola sottopopolazione cellulare CD133⁺/CD44v6/c-Met. L'identificazione e l'isolamento delle cellule staminali tumorali costituisce quindi un cambiamento importante per la comprensione dei meccanismi di carcinogenesi e di formazione delle metastasi, e mette in luce la necessità primaria dello sviluppo di strategie terapeutiche altamente specifiche. Come intervenire per colpire le cellule staminali tumorali? Da un lato, lo studio dei meccanismi che conferiscono a tali cellule un'elevata resistenza ai trattamenti convenzionali, quali la chemioterapia, è sicuramente di primaria importanza per lo sviluppo di terapie di tipo selettivo. A tal proposito, è stato recentemente dimostrato che l'IL-4 induce resistenza all'apoptosi indotta dai chemioterapici nelle cellule staminali tumorali. Per cui, interferendo con il pathway cellulare regolato da questa citochina, attraverso ad esempio l'utilizzo di anticorpi neutralizzanti, è possibile ottenere una sensibilizzazione significativa delle cellule staminali tumorali alla chemioterapia. Inoltre, l'inibizione della stessa via di trasduzione del segnale causa una riduzione dei livelli delle varianti CD44v5 e v6, e può essere quindi utilizzata per ridurre la capacità invasiva delle cellule con potenziale metastagenico.

Dall'altro lato, una strategia alternativa per colpire le cellule staminali tumorali si basa sull'induzione al differenziamento, in quanto le cellule tumorali terminalmente differenziate sono di per sé non tumorigeniche a causa del loro limitato potenziale proliferativo ed inoltre sono più sensibili ai trattamenti chemioterapici. Tra i fattori che regolano il programma morfogenetico del colon, BMP4, espresso unicamente dalle cellule differenziate, è in grado di indurre il differenziamento delle cellule staminali tumorali contrastando la loro capacità tumorigenica e di aumentare gli effetti citotossici della chemioterapia. Infatti è stato sperimentalmente dimostrato mediante esperimenti *in vivo* che i farmaci chemioterapici non sono in grado di prevenire la crescita tumorale, mentre il trattamento combinato con BMP4 risulta in una completa risposta terapeutica, mantenuta anche dopo l'interruzione del trattamento.

Bibliografia

1. Reya T, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414 (6859): 105.

2. Dalerba P, Cho RW, Clarke M.F. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007; 58: 267-284.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100 (1): 57-70.
4. Al-Hajj M, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100 (7): 3983-3988.
5. Singh SK, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63 (18): 5821-5828.
6. Singh SK, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432 (015): 396-401.
7. O'Brien CA, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007; 445 (7123): 106-110.
8. Ricci-Vitiani L, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007; 445 (7123): 111-115.
9. Bonnet D, JE Dick. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; 3 (7): 730-737.
10. Nakamura M, et al. Musashi, a neural RNA-binding protein required for *Drosophila* adult external sensory organ development. *Neuron* 1994; 13 (1): 67-81.
11. Imai T, et al. The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA. *Mol Cell Biol.* 2001; 21 (12): 3888-3900.
12. Nishimura S, et al. Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci.* 2003; 48 (8): 1523-1529.
13. Barker N, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature.* 2007; 449 (7165): 1003-1007.
14. Sato T, et al. Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009; 459 (7244): 262-265.
15. Salven P, et al. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood.* 2003; 101 (1): 168-172.
16. Uchida N, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97 (26): 14720-14725.
17. Corti S, et al. Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Exp Neurol.* 2007; 205 (2): 547-562.
18. Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 2008; 214 (1): 3-9.
19. Dalerba P, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104 (24): 10158-10163.
20. Cammareri P, et al. Isolation and culture of colon cancer stem cells. *Methods Cell Biol.* 2008; 86: 311-324.
21. Scopelliti A, et al. Therapeutic implications of cancer initiating cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2009; 9 (8): 1005-1016.

Molecular dissection of the EGFR oncogenic pathway to predict clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer

Salvatore Siena, Andrea Sartore-Bianchi

The Falck Division of Medical Oncology, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

Introduction

The introduction of *KRAS* testing as a diagnostic tool to select patients for EGFR-targeted cetuximab- or panitumumab-based therapies for metastatic colorectal cancer (mCRC) has been widely regarded as one of the most important recent advance in the field of personalized cancer medicine (1). Oncologists are now facing a new era in the treatment of mCRC with these drugs, in which unprecedented issues should be addressed. These pertain to:

- a) the identification of additional genetic determinants of primary resistance to EGFR-targeted therapy for further improving selection of patients,
- b) the explanation of rare cases of patients carrying *KRAS*-mutated tumors who have been reported to respond to either cetuximab or panitumumab (2-4),
- c) the discovery of mechanisms of secondary resistance to anti-EGFR antibody therapies. This article will focus on the first of this issue; current data suggest indeed that, together with *KRAS* mutations, also the evaluations of *BRAF* and *PIK3CA/PTEN* alterations could be useful for selecting mCRC patients unlikely to respond to EGFR-targeted antibodies. *EGFR* gene copy number detection also appears relevant to positively identify responders. At present, each of these markers has been mainly assessed as single event, often in retrospective analyses and patients series (Fig. 1), but these molecular alterations display overlapping pattern of occurrence, thus adding complexity for drawing an algorithm suitable for clinical decision making. For this reason, studies of last generation by our group and others nowadays include comprehensive integrated analysis of the entire oncogenic pathway triggered by the EGFR, with the aim of enhancing the prediction ability of the markers individually used.

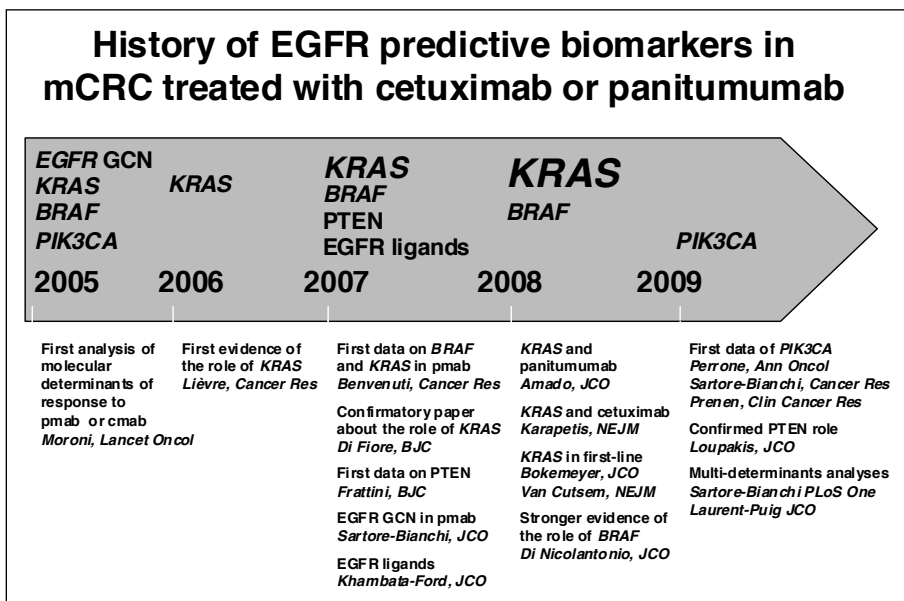


Fig. 1 - Timeline of the principal studies assessing the role of molecular determinants of response/resistance to cetuximab or panitumumab in mCRC.

Beyond KRAS: oncogenic activation of other effectors downstream of EGFR that could preclude responsiveness to cetuximab or panitumumab

The occurrence of *KRAS* mutations only accounts for about 30-40% of non-responsive patients and, accordingly, *KRAS* mutations can be considered a highly specific negative biomarker of response (specificity 93%) but they are also poorly sensitive (sensitivity 47%) (3). The identification of additional genetic determinants of primary resistance to EGFR targeted therapies in mCRC is therefore important to prospectively identify patients that should not receive either cetuximab or panitumumab, thus avoiding their exposure to ineffective and expensive therapy. Recent work has therefore been focused on further molecular dissection of the two main axes of which the signaling cascade of EGFR is comprised. On one side, the KRAS-RAF-MAPK signaling pathway is thought to control cell growth, differentiation and apoptosis. Kirsten (K)RAS belongs to gene family of oncogenes (KRAS, HRAS and NRAS) encoding guanosine di/tri phosphate (GDP/GTP)-binding proteins that act as self-inactivating intracellular signal transducers. Following Grb2/SOS mediated activation GTP bound KRAS, recruits the serine protein BRAF, thus starting a cytoplasmic phosphorylation cascade leading to the activation of transcription factors (5). The other axis involves membrane localization of the lipid kinase PIK3CA, which promotes AKT activation ensuing a parallel intracellular propagation of the signal. Importantly, the two axes (KRAS/BRAF and PIK3CA) are closely related and strictly interconnected, as the p110 subunit of PI3K can also be activated via

interaction with RAS proteins. Such close interactions between these axes may provide “escape mechanisms” that allow tumors to circumvent a pathway that has been pharmacologically blocked. Mutations in *KRAS*, *BRAF* or *PIK3CA* result in continuous activation of the downstream RAS-MAPK or PI3K pathways, regardless of whether the EGFR is activated or pharmacologically blocked. Such activation eventually enhances transcription of various oncogenes, including MYC, CREB, and the gene for nuclear factor κ B (6, 7).

BRAF - The *BRAF*^{V600E} mutation, a thymine to adenine transversion mutation, resulting in the substitution of valine with glutamate, appears in 4-15% of CRC (8-10). Of note, *KRAS* and *BRAF* mutations are known to be mutually exclusive in CRC (11). The first analysis assessing the role of the *BRAF*^{V600E} mutation as a predictive molecular factor to EGFR-targeted therapy was performed in a cohort of 113 tumors from patients who received panitumumab/cetuximab in second or subsequent lines of treatment (12). Results from this retrospective analysis showed that, among *KRAS* wild-type patients, those whose tumors displayed the *BRAF*^{V600E} mutation (14%) did not respond to EGFR inhibition and had statistically significantly shorter progression-free survival (PFS) ($p=0.001$) and overall survival (OS) ($p<0.001$) than patients whose tumors carried wild-type *BRAF*. In the same article, Di Nicolantonio et al. also demonstrated that introduction of the *BRAF*^{V600E} allele could confer resistance to either cetuximab or panitumumab in wild-type *BRAF* CRC cells. Furthermore, they showed that the multikinase inhibitor sorafenib may restore sensitivity to EGFR inhibitors in *BRAF*-mutated CRC cell lines (12). Consequently, combined sorafenib and cetuximab therapy is undergoing clinical evaluation in mCRC in a National Cancer Institute-sponsored trial (NCT00343772; <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00343772>).

Loupakis et al. performed a retrospective analysis among 87 irinotecan refractory patients, treated with anti-EGFR therapy (13). They found that *BRAF* was mutated in 13 cases (15%): none of the patients bearing *BRAF* mutation responded to the treatment, in comparison with 24 (32%) of 74 patients with *BRAF* wild-type disease ($p=0.016$). *BRAF* mutation was also associated with a trend towards shorter PFS (median PFS: 2.6 vs 4.4 months in *BRAF* wild-type, $p=0.073$) and with significantly shorter OS (median OS: 4.1 vs 13.9 months in *BRAF* wild-type; $p=0.037$).

There is now growing evidence that the presence of a *BRAF*^{V600E} mutation in the primary tumor identifies patients with poorer prognosis, regardless of the treatment regimen (ie, chemotherapy or chemotherapy combined with EGFR-targeted monoclonal antibodies) and this prognostic value could override its predictive role. In the randomized phase III CRYSTAL study (14) in which patients with mCRC were treated with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin (FOLFIRI) or FOLFIRI plus cetuximab as first-line therapy, *BRAF*^{V600E} mutations were detected in 60 of the 1000 evaluable patients (6.0%). Patients with tumors containing *BRAF* mutations displayed poorer PFS and OS respect to patients with tumors carrying wild-type *BRAF* in both the FOLFIRI and FOLFIRI plus cetuximab arms, thus supporting the hypothesis that *BRAF* mutational status is a powerful

negative prognostic factor, because it is correlated with worse survival that is independent of the type of treatment received. A retrospective analysis of the *BRAF*^{V600E} mutation status was also performed in 516 tumors from patients treated with first-line cetuximab plus capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab (CBC) or capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab (CB) in the CAIRO-2 study (15). A *BRAF* mutation was detected in 45 tumors (8.7%). In the subgroup of patients treated with CBC the median progression-free interval and OS were 6.6 and 15.2 months for patients with tumors carrying mutant *BRAF* vs 10.4 (p=0.01) and 21.5 (p=0.001) months in those with tumors carrying wild-type *BRAF*. In the subgroup of patients treated with CB the median progression-free interval and OS were 5.9 and 15 months for patients with tumors carrying mutant *BRAF* vs 12.2 (p=0.003) and 24.6 (p=0.002) months in those with tumors carrying wild-type *BRAF*. However, the response rate in the two treatment groups did not differ significantly. The authors concluded that a *BRAF* mutation is a negative prognostic marker in patients with mCRC and that this effect, in contrast to *KRAS* mutations, is not restricted to the outcome of cetuximab treatment (15). The prognostic value of *BRAF* mutation was highlighted also by Souglakos et al., who determined *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutations in tumours from 168 patients treated with 5-FU-based first-line chemotherapy. Multivariate analysis uncovered *BRAF* mutation as an independent prognostic factor for decreased survival in this setting (HR 4.0, 95% confidence interval (CI) 2.1-7.6). In addition, *BRAF* mutation predicted more rapid disease progression in patients treated with first-line oxaliplatin- (HR 6.4, 95% CI 2.6-15.6), irinotecan- (HR 4.1, 95% CI 1.5-11.3), or oxaliplatin and irinotecan (HR 7.9, 95% CI 1.3-48.2), as well as bevacizumab containing (HR 5.1, 95% CI 2.4-11.1) regimens (16). In a recently reported analysis, Roth et al. (17) studied resection specimens (n=1564) prospectively collected from the PETACC-3 randomized phase III trial assessing the role of irinotecan added to fluorouracil (FU)/leucovorin as adjuvant treatment for stages II and III colon cancer, in order to assess the prognostic role of tumor *KRAS* and *BRAF* status in relation to relapse-free survival and OS. In univariate and multivariate analysis, *KRAS* mutations did not have a major prognostic value regarding relapse-free survival or OS. On the other hand, *BRAF* mutation was not prognostic for RFS, but was for OS, particularly in patients with MSI-low and stable tumors (HR 2.2; 95% CI, 1.4 to 3.4; p=0.0003). The Authors concluded that in stage II-III colon cancer, the *KRAS* mutation status does not have major prognostic value, while *BRAF* is prognostic for OS in MS-L/S tumors.

In conclusion, although a *BRAF*^{V600E} mutation is being recognized as a prognostic determinant in CRC (14-17), univocal evidence derived from preclinical cellular models (12) and clinical trials of cetuximab or panitumumab in patients with chemotherapy-refractory mCRC indicates that this molecular alteration is also predictive of resistance to EGFR-targeted therapy (Tab. 1). A negative prognostic role has also been reported for *KRAS* mutations (18), and yet this biomarker is currently used to exclude patients from EGFR-targeted therapy. The large datasets in which the negative predictive value of *KRAS* mutations has been unequivocally established (2, 19) are also ideally suited to assess the role of *BRAF* mutations.

Tab. 1 - Published studies of patients with chemorefractory metastatic colorectal cancer and the negative predictive value of the BRAF V600E mutation for response to EGFR-targeted monoclonal antibodies.

Author (reference)	No. of patients evaluated with wild-type KRAS	No. of patients with BRAF ^{V600E} mutations (%)	No. of patients with an objective response/No. of total patients (%)	
			BRAF ^{V600E} mutation	Wild-type BRAF
Di Nicolantonio (12)	79	11 (14)	0/11 (0)	22/69 (32)
Laurent-Puig (26)	116	5 (4)	0/5 (0)	52/111 (47)
Souglakos (16)*	92	9 (10)	0/9 (0)	14/83 (17)
Loupakis (13)	87	13 (15)	0/13 (0)	24/74 (32)
Overall	374	38 (10)	0/38 (0)	112/342 (33)

*Subset of patients treated with salvage cetuximab or panitumumab therapy.

PIK3CA and PTEN - In addition to KRAS and BRAF, the HER family of receptor also activates the PI3K signaling pathway, which in turn can be oncogenically deregulated either by activating mutations in the *PIK3CA* p110 subunit or by inactivation of the PTEN phosphatase. The role of deregulated PIK3CA/PTEN signaling on the response to targeted therapy has therefore been investigated in breast (20), glioblastoma (21) and also mCRC. The *PIK3CA* mutations occur in approximately 10-18% of CRC patients, principally located in exon 9 and 20 (10, 22), whereas loss of PTEN expression by immunohistochemistry (IHC) is reported in 19-42% (23-26).

In vitro studies in various CRC cell lines have shown that activating *PIK3CA* mutations or loss of PTEN expression appeared to confer resistance to cetuximab. Cell lines that were either *PIK3CA* mutated, or PTEN null, and also had mutations in *RAS* or *BRAF* exhibited the greatest resistance to cetuximab (27). In the clinical setting, the first three studies analyzing *PIK3CA* mutations (4, 28, 29) reported together nine (10%) tumors bearing *PIK3CA* mutations and only one responded to EGFR-targeted treatment. In a larger patient series (n=110), we found that *PIK3CA* mutations and PTEN loss in colorectal tumors were statistically significantly associated with lack of response to panitumumab (0/15 patients, p=0.038) or cetuximab (1/32 patients, p=0.001) treatment (30). In the same study, *PIK3CA* mutations and/or loss of PTEN expression were negatively associated with PFS, and loss of PTEN expression was also linked with poorer OS (p=0.005). This negative association with PFS was also noted in a study by Souglakos et al. (16), where among 92 patients treated using chemotherapy and cetuximab as salvage therapy, *PIK3CA* mutations predicted reduced PFS (2.5 vs 3.9 months, HR 2.1, 95% CI 1.2-3.9). In contrast, Prenen et al. have recently reported in a series of 200 mCRC patients that twenty-three (12%) carried a *PIK3CA* mutation and five of these (22%) were found in responders (31). This means that 5 of 39 responders (13%) and 18 of 160 non-responders (11%) carried a *PIK3CA* mutation, thus not supporting a significant association between *PIK3CA* mutations and lack of response to cetuximab (p=0.781). The median PFS and OS did also not differ significantly between *PIK3CA* mutant and wild-type patients.

Ogino et al. studied the prognostic role of *PIK3CA* in specimens from 450 mCRCs that underwent curative surgery (stage I to III) (32). *PIK3CA* mutations were found in 18% of tumors. Compared with patients with *PIK3CA* wild-type tumors, those with *PIK3CA*-mutated tumors experienced an increase in colon cancer-specific mortality (HR 1.64; 95% CI, 0.95 -2.86). Of note, this negative prognostic effect was limited to *KRAS* wild-type tumors, as *PIK3CA* mutation conferred no significant effect on mortality among patients with *KRAS*-mutated tumors.

Frattini et al. (23) reported that none of 11 patients with tumor PTEN loss responded to cetuximab-based treatment, whereas 10 (63%) of 16 patients with intact PTEN protein expression were partial responders. Perrone et al. (29) also noted that none of three patients with PTEN mutations responded to treatment with cetuximab and irinotecan. Razis et al. (33) reported that normal PTEN protein expression was associated with a higher response rate and longer time to progression in patients treated with cetuximab-based therapy, despite a 50% response rate observed in patients who had lost PTEN protein expression. Loupakis et al. performed a retrospective analysis on the status of PTEN in a cohort of 55 metastases from patients with irinotecan refractory mCRC treated with irinotecan and cetuximab: 12 (36%) of 33 patients with PTEN-positive metastases were responders compared with one (5%) of 22 who had PTEN-negative metastases ($p=0.007$) (24). The median PFS of patients with PTEN-positive metastases was 4.7 months compared with 3.3 months for those with PTEN-negative metastases ($p=0.005$). Patients with PTEN-positive metastases and *KRAS* wild type had longer PFS compared with other patients (5.5 months v 3.8 months; $p=0.001$). In the same study the Authors also showed a poor concordance rate between IHC evaluation of PTEN loss between primary tumor and metastases in 45 paired samples (60%), and that PTEN status on primary tumors did not predict response or PFS.

In conclusion, available analyses highlight the role of *PIK3CA* mutations in predicting resistance to cetuximab and panitumumab, although this association is not as strong as the one observed for *KRAS* or *BRAF* mutations, thus not supporting the use of this molecular determinant by itself for clinical decision making. Conflicting results in published works (30, 31) could be, at least partly, explained by the heterogeneity of patients series in terms of the distribution of mutations (i.e. exon 9 vs exon 20), since it has been demonstrated that mutations located in different hotspots exert different biochemical and oncogenic properties and are differently activated by *KRAS* (34). As for PTEN, most of the authors agree that its inactivation is a negative predictor of response (23, 24, 30). This molecular alteration is caused often by epigenetic mechanisms (35), supporting the detection of the intact protein by IHC as a better diagnostic tool than gene sequencing, as it potentially covers more mechanisms of alteration. On the other hand, the lack of standardization of this analysis is likely to affect its clinical application (36). Moreover, it has been reported poor concordance rate between expression in primary tumor vs metastatic sites (24), introducing further complexity in the molecular diagnostic work-up.

Increased *EGFR* gene dosage as a positive predictive factor of clinical outcome to EGFR-targeted monoclonal antibodies

Contrary to other situations in which the genomic locus corresponding to an oncogene is frankly amplified (*PIK3CA*, *MET*), thus resulting in largely augmented expression of the corresponding protein product, it seems clear that the increase in *EGFR* gene copy number is often modest (three- to five-fold) and caused by polysomy rather than gene amplification, without a significant increase of the receptor protein (36).

Nevertheless, a biological phenomenon underlying the association between an increase in *EGFR* copy number and positive clinical outcome to EGFR-targeted monoclonal antibodies certainly does exist, as confirmed by different analyses of patients' series (Tab. 2). This molecular alteration can be detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) (37), chromogenic in situ hybridization (CISH) (38) or polymerase chain reaction (PCR), although the latter method seems not to be associated with response to anti-EGFR therapy in published cohorts (39, 40).

Tab. 2. - Tumor epidermal growth factor receptor gene copy number and outcome of panitumumab- or cetuximab-based treatment in patients with metastatic colorectal cancer.

	Author (reference)	Treatment	GCN cutoff; (methodology)	RR (%)	p (months)	PFS p (months)	OS p	p	
Unselected population	Sartore-Bianchi (41)	Panitumumab monotherapy	≥2.47 <2.47 (FISH)	30% 0%	0.0009	8 3	0.039	15 10	0.015
	Cappuzzo (45)	Cetuximab ± CT	≥2.92 <2.92 (FISH)	32.6% 2.4%	0.0001	6.6 3.5	0.02	11.3 8.5	0.8
	Personeni (44)	Cetuximab ± CT	≥2.83 <2.83 (FISH)	NA	NA	5.5 4.0	0.25	10 8.3	0.037
	Frattini (23)	Cetuximab ± CT	≥4 <4 (FISH)	22% 14%	0.05	NA	NA	NA	NA
	Lievre (28)	Cetuximab ± CT	≥6 <6 (CISH)	27% 0%	0.04	NA	NA	NA	NA
	Moroni (4)	Panitumumab or cetuximab ± CT	≥3 <3 (FISH)	89% 5%	<0.001	NA	NA	NA	NA
KRAS wild-type population	Scartozzi (42)	Cetuximab + CT	≥2.6 <2.6 (FISH)	60% 9%	0.002	7.7 2.9	0.04	NA	NA
			≥2.12 <2.12 (CISH)	36% 6%	0.03	6.4 3.1	0.02		
	Laurent-Puig (26)	Cetuximab + CT	≥2.0 <2.0 (FISH)	71% 37%	0.015	8 7	ns	16.2 11.8	ns

GCN: gene copy number; RR: response rate; PFS: progression-free survival; OS: overall survival; CT: chemotherapy; NA: not available; ns: not statistically significant.

A study by our group was the first that demonstrated the association between *EGFR* gene copy number (GCN), determined by FISH analysis, and response to anti-EGFR monoclonal antibodies (4). We described an 89% response rate in a subgroup of nine patients with colorectal cancer whose tumors had an increased *EGFR* GCN, including a relatively high proportion of responders (9 of 29 patients; 31%) in the analysis. These findings were confirmed from a subsequent study in a retrospective analysis of a subgroup of patients participating in the pivotal phase III trial of panitumumab monotherapy (41). The mean *EGFR* GCN per nucleus and the percentage of tumor cells with chromosome 7 polysomy (three or more *EGFR* signals per nucleus) were analyzed by FISH and the association between these parameters and clinical outcome was assessed. None of the patients with a mean of 2.47 or less *EGFR* gene copies per nucleus, or fewer than 43% of tumor cells with chromosome 7 polysomy, respectively, achieved objective response, compared with six (30%) of the 20 patients ($p=0.001$) and six (32%) of the 19 patients ($p=0.001$) who had values above these thresholds. A mean *EGFR* GCN threshold of less than 2.5 copies per nucleus or fewer than 40% of tumor cells with chromosome 7 polysomy discriminated patients with shorter PFS ($p=0.039$ and $p=0.029$, respectively) and OS ($p=0.015$ and $p=0.014$, respectively). Moreover, *EGFR* GCN and chromosome 7 polysomy status did not influence progression-free interval in patients receiving only supportive care in this study, suggesting that this parameter is not prognostic in mCRC. The association between *EGFR* GCN increase and response to anti-EGFR therapy, both cetuximab and panitumumab, was reported with different cut-offs by subsequent studies, summarized in Table 2. Most recent studies are now focusing on *EGFR* GCN as an additional determinant of response in *KRAS* wild-type patients; in particular Scartozzi et al. assessed the role of *EGFR* GCN in 44 irinotecan-refractory *KRAS* wild-type CRC patients treated with irinotecan and cetuximab, using both FISH and CISH techniques (42).

They reported a statistical significant association between GCN and response rate, observing a tumor regression in 9 (60%) and 2 (9%) cases with an increased and low FISH *EGFR* GCN, respectively ($p=0.002$) and in 10 (36%) and 1 (6%) cases with an increased and low CISH *EGFR* GCN, respectively ($p=0.03$). Median time to progression was 7.7 and 6.4 months in patients showing increased FISH and CISH *EGFR* GCN, whereas it was 2.9 and 3.1 months in those with low FISH and CISH *EGFR* GCN ($p=0.04$ and 0.02 respectively) (42). Laurent-Puig et al conducted a comprehensive analysis including the evaluation of *EGFR* amplification/polysomy status by FISH and CISH in 96 *KRAS*-wild-type tumors (26). An *EGFR* FISH-positive phenotype was found in 17 patients (17.7%) who showed a statistically significant higher response rate (71%) respect to patients with normal *EGFR* copy number (37%), $p=0.015$. A trend toward longer PFS and OS was found in patients with FISH-positive phenotype but without reaching a threshold of significance. The Authors used the FISH scoring algorithm developed by Hirsch et al. (43) and reported an accuracy test of 64.9%. Of note, they applied to the same population of patients different FISH scoring algorithms reported in previous papers as useful to discriminate patients with tumour

response to cetuximab, in particular an EGFR-to-chromosome probe intensity ratios of 2.47, 2.83 and 2.92 (41, 44, 45), obtaining an accuracy of 57.7%, 63.9% and 64.9% respectively (26).

In conclusion, in mCRC the *EGFR* FISH pattern is often not homogeneous, displaying variable degrees of disomy, polysomy or, less, amplification. In this situation, providing a scoring algorithm is difficult, and in order to overcome this problem we proposed to use the percentage of cells showing chromosome 7 polysomy (*EGFR* per nucleus ≥ 3) or amplification (*EGFR* to *CEP7* ≥ 2) (41) rather than the mean *EGFR* GCN in the examined tumor areas. However, the reproducibility of data remain the largest obstacle for clinical applicability of this molecular determinant and, although eight studies (4, 23, 26, 28, 41, 42, 44, 45) have confirmed its predictive usefulness, methods of tissue processing and *EGFR* scoring systems need to be standardized before using it as a tool for selecting patient for EGFR-targeted therapy.

Multi-determinants analyses to predict clinical outcome to cetuximab or panitumumab

Most recent studies of molecular biomarkers of response to cetuximab or panitumumab are now including comprehensive integrated analysis of different effectors along the pathway triggered by the EGFR, with the aim of enhancing the prediction ability of the markers used individually. In particular, in a recent work (25) we hypothesized that mCRCs could be classified basing on the number of molecular abnormalities detected among known alterations within the EGFR pathway. We retrospectively analyzed objective tumor response, PFS and OS together with the mutational status of *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* and expression of PTEN in 132 tumors from cetuximab or panitumumab treated mCRC patients. Among the 106 non-responsive patients, 74 (70%) had tumors with at least one molecular alteration in the four markers. Of note, while mutations of *KRAS* and *BRAF* confirmed to be mutually exclusive, an overlapping pattern was observed among other alterations, the most frequent overlapping fingerprints being PTEN loss and *KRAS* mutations (co-occurring in 13 patients), and *BRAF* and *PIK3CA* mutations (in 7 patients) (Fig. 2).

Among the 96 wild-type *KRAS* patients, loss of PTEN showed a significant association with lack of response ($p < 0.001$), while *BRAF* was not significant ($p = 0.265$) and *PIK3CA* exerted a borderline effect ($p = 0.075$). Survival analyses demonstrated that *BRAF* mutations (HR 3.75, $p = 0.015$) and loss of PTEN (HR 0.43, $p = 0.009$), but not *PIK3CA* mutations (HR 1.20, $p = 0.672$), were significantly associated with decreased OS, whereas none of these alterations was significantly associated with PFS.

In light of the occurrence of multiple molecular alterations within the same tumor, we investigated our cohort by separating patients according to the actual number of molecular abnormalities in the same tumor, i.e., none vs 1 vs ≥ 2 alterations. The probability of response was 51% (22/43) among patients with no alterations, 4% (2/47) among patients with 1 alteration, and 0% (0/24) for patients

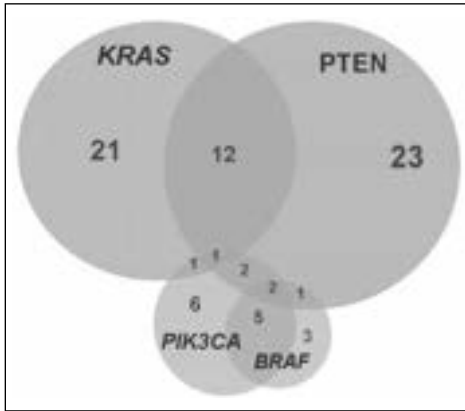


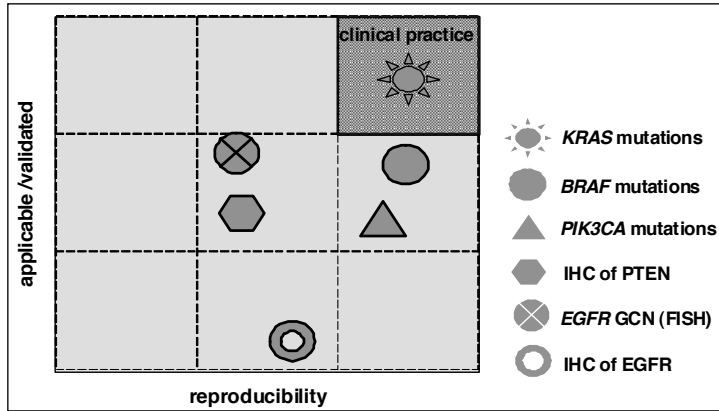
Fig. 2 - Representation of the distribution of molecular alterations in individual tumors from a study of 132 patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab or panitumumab: mutations of KRAS and BRAF occurred in a mutually exclusive manner, while an overlapping pattern was observed between other alterations.

with ≥ 2 alterations ($p < 0.0001$). Accordingly, PFS and OS were increasingly worse for patients with tumors harboring none, 1, or ≥ 2 molecular alterations ($p < 0.001$). Based on these findings, we proposed a new algorithm that deserves validation in prospective studies for deciding the clinical use of EGFR-targeted monoclonal antibodies. The aim of the multiple molecular testing is indeed to identify mCRCs lacking the three mutations and loss of PTEN (“quadruple negative”) as the most sensitive to cetuximab or panitumumab therapy.

Laurent-Puig et al. (26) reported a similar comprehensive analysis of molecular biomarkers, including *EGFR* GCN (see previous section) but not *PIK3CA* evaluation and focusing on *KRAS* wild-type tumors. They retrospectively collected specimens from 173 patients with mCRC treated with a cetuximab-based regimen as \geq second-line. In patients with *KRAS* wild-type tumors ($n=116$), *BRAF* mutations (3%) were weakly associated with lack of response ($p=0.063$) but were strongly associated with shorter PFS ($p < 0.001$) and shorter OS ($p < 0.001$). A high *EGFR* polysomy or an *EGFR* amplification was found in 17.7% of the patients and was associated with response ($p=0.015$). PTEN null expression was found in 19.9% of the patients and was associated with shorter OS ($p=0.013$). In multivariate analysis, *BRAF* mutation and PTEN expression status were associated with OS. Authors concluded that in patients with wild-type *KRAS*, mutations in *BRAF* are associated with response, PFS, and OS; *EGFR* amplification is associated with response although clinical decisions based on *EGFR* copy number are not warranted as long as FISH technology and scoring are not standardized; and PTEN protein expression is associated with OS, thus supporting a prognostic role of this determinant.

In conclusion, important advances have been made toward personalized cancer therapy for cetuximab and panitumumab. The molecular dissection of the EGFR pathway proved to be an efficacious strategy for selecting mCRCs to treat with these compounds, as hypothesized by our first research works (4, 46). Each one of the molecular determinants evaluated in this review demonstrated indeed to affect clinical outcome to EGFR-targeted monoclonal antibodies, although, by itself, only *KRAS* reached the clinical practice (Fig. 3). We feel that the best strat-

Fig. 3 - Diagram representing potential clinical application of principal biomarkers predicting clinical outcome to EGFR-targeted monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer. Each biomarker has been placed basing on its reproducibility and validation from published studies.



egy has been the evaluation of these biomarkers in the context of a multi-determinants analysis including both the KRAS-RAF-MAPK and the PI3K-PTEN-AKT signaling pathways (25, 26), providing predictive algorithms that are ready for validation in prospective trials. Moreover, in a near future, the therapeutic armamentarium for mCRC will be further expanded by introduction of novel targeted agents, and current data from comprehensive integrated analysis of different effectors along the EGFR pathway will support a rational selection among different available options.

Bibliografia

1. Winer E, Gralow J, Diller L, et al. American Society of Clinical Oncology. Clinical cancer advances 2008: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening - a report from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 812-826.
2. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008; 359: 1757-1765.
3. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2008; 9: 962-972.
4. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, et al. (2005) Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.* 2005; 6: 279-286.
5. Bos JL. RAS oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989; 49: 4682-4689.
6. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 127-137.
7. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, et al. (2006) Roles of the

- RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul.* 2006; 46: 249-279.
8. Tan YH, Liu Y, Eu KW, et al. Detection of B-RAF V600E mutation by pyrosequencing. *Pathology.* 2008; 40: 295-298.
 9. Calistri D, Rengucci C, Seymour I, et al. Mutation analysis of p53, KRAS and B-RAF genes in colorectal cancer progression. *J Cell Physiol.* 2005; 204: 484-488.
 10. Barault L, Veyrie N, Jooste V, et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer* 2008; 122: 2255-2259.
 11. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatchrepair status. *Nature.* 2002; 418: 934.
 12. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 5705-5712.
 13. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009; 18: 715-721.
 14. Van Cutsem E, Lang Y, Folprecht G, et al. Cetuximab plus FOLFIRI in the treatment of metastatic colorectal cancer - the influence of KRAS and BRAF biomarkers on outcome: update data from the CRYSTAL trial. *Proceedings of the 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium.* Abstract n. 281.
 15. Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009; 361: 98-99.
 16. Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, et al. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009; 101: 465-472.
 17. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 466-474.
 18. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *Natl Cancer Inst.* 2008; 90: 675-684.
 19. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 1626-1634.
 20. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 2004; 6: 117-127.
 21. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med.* 2005; 353: 2012-2024.

22. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, et al. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer*. 2005; 41:1649-1654.
23. Frattini M, Saletti P, Romagnani E, et al. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2007; 97: 1139-1145.
24. Loupakis F, Pollina L, Stasi I, et al. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 2622-2629.
25. Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, et al. Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS One*. 2009; 4:e7287.
26. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 5924-5930.
27. Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res*. 2008; 68: 1953-1961.
28. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006; 66: 3992-3995.
29. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2009; 20: 84-90.
30. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, et al. PIK3CA Mutations in Colorectal Cancer Are Associated with Clinical Resistance to EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies. *Cancer Res*. 2009; 69: 1851-1857.
31. Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, et al. PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 3184-3188.
32. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 1477-1484.
33. Razis E, Briasoulis E, Vrettou E, et al. Potential value of PTEN in predicting cetuximab response in colorectal cancer. An exploratory study. *BMC Cancer*. 2008; 8: 234.
34. Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 2652-2657.
35. Goel A, Arnold C, Niedzwiecki D, et al. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res*. 2004; 64: 3014-3021.
36. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. Epub ahead of print. 2010.

37. Ooi A, Takehana T, Li X, et al. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol.* 2004; 17: 895-904.
38. Shia J, Klimstra DS, Li AR, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol.* 2005; 18: 1350-1356.
39. Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, et al. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 4914-4921.
40. Vallböhmer D, Zhang W, Gordon M, et al. Molecular determinants of cetuximab efficacy. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 3536-3544.
41. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 3238-3245.
42. Scartozzi M, Bearzi I, Mandolesi A, et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gene copy number (GCN) correlates with clinical activity of irinotecan-cetuximab in K-RAS wild-type colorectal cancer: a fluorescence in situ (FISH) and chromogenic in situ hybridization (CISH) analysis. *BMC Cancer* 2009; 9: 303.
43. Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, et al. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 3351-3357.
44. Personeni N, Fieuws S, Piessevaux H, et al. Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 5869-5876.
45. Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, et al. EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann Oncol.* 2008; 19: 717-723.
46. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* 2007; 67: 2643-2648.

Epigenetics programs in stem-like cells of glioblastoma multiforme

Gaetano Finocchiaro

Unità di Neuroncologia e Terapia Genica, Fondazione Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milano

In 1992 Reynolds and Weiss showed that neural stem cells (NSC) can be present in adult brain: when cultured in the presence of epidermal growth factor (EGF), NSC formed neurospheres (NS), floating aggregates mostly populated by progenitor and differentiated cells (1). The NS assay has gained considerable popularity as a robust and reproducible method to grow NS in vitro (2). More recently the *in vitro* growth as NS of cells from glioblastoma multiforme (GBM) has been considered as consequent to the presence of stem-like cells in GBM (3).

There is growing consensus on the idea that GBM NS resemble more closely the biology of the original tumor than serum-cultured cell lines and are therefore an important tool to study such biology and evaluate novel treatments (4, 5). Several recent studies have proposed that the growth of solid tumors, including GBM, is driven by cancer stem-like cells (CSC), i.e. the fraction of cells that in murine hosts (and possibly in the original tumor) is responsible for tumor perpetuation (6, 7). As NS mirror the primary tumor, it seems likely that they act as a sort of *in vitro* niche for CSC. The most investigated marker for GBM CSC has been CD133 (prominin 1 in mice) and initial studies proposed that only CD133-positive cells could form NS in vitro and re-initiate the tumor in immune deficient mice (8). Further studies also found a positive correlation between CD133 expression and GBM aggressiveness, as expressed by patient survival (9, 10).

We have obtained NS or adherent cells (AC, growing in the presence of serum and without EGF or bFGF) from GBM specimens obtained after surgery at the Istituto Neurologico Besta (11) (Fig. 1). We found that 40 of 76 (52%) GBM examined formed NS: 17 of 76 (22%) formed NS only, 23 of 76 (30%) NS and AC, 10 of 76 (13%) AC only. To investigate *in vivo* tumorigenicity of NS and AC obtained from some of these GBM, 32 nude mice were injected intracerebrally, 17 with NS and 15 with AC, and their survival evaluated. All mice injected by NS died by day 159 while AC were lethal later and only in 50% of the mice ($p=0.0004$). Histology confirmed that tumors from NS are large and highly invasive, as they were often visible in the contralateral hemisphere.

We also assessed survival in patients whose tumors gave rise or not to NS. Thirty six patients, all treated by surgery, radiotherapy and chemotherapy with temo-

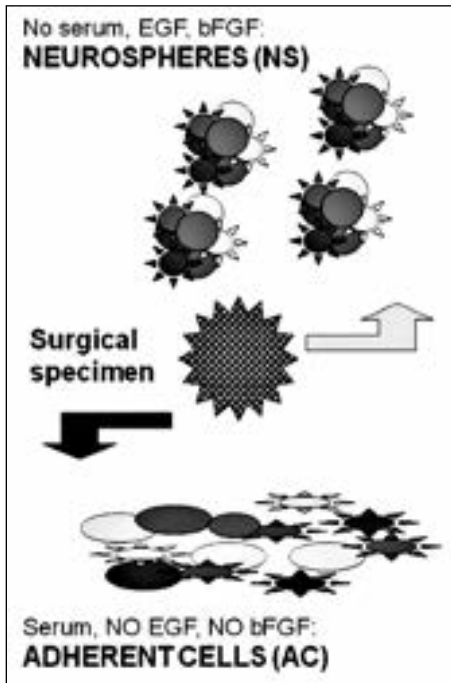


Fig. 1 - GBM cells can grow in vitro as stem-like neurospheres or as adherent cells.

zolomide according to the Stupp protocol (12), were amenable to this analysis: NS were obtained from 19 of these GBM. Median overall survival was 10 months for patients with GBM forming NS and 14 months for the others ($p=0.018$). A similar trend was observed in seven patients with relapsing GBM: the median survival was four months after relapse for patients with GBM forming NS and 11 months for the others. To assess if age and NS formation were independent parameters affecting survival we performed a multivariate analysis and found that NS formation is the only significant parameter ($p<0.004$; relative risk 2.89, 95% CI 1.0-7.95).

In our previous expression screening on NS and AC obtained from murine glioma GL261 cells (13) we noticed significant up-regulation in GL261-NS of the Polycomb gene *EZH2* (2.72 folds in NS vs AC, $p<0.01$). Because of the relevant role of *EZH2* in other cancers (14) we decided to investigate its expression further by Affimetrix screening on human GBM-NS and -AC. Data obtained from cells of five GBM confirmed up-regulation of *EZH2* in human GBM NS (3.3 ± 1.3 folds NS vs AC, respectively). We extended further the comparison of *EZH2* expression to 10 other GBM cell pairs that were investigated by real-time PCR: expression was 7.3 ± 9.2 folds higher in NS than in AC ($p=0.003$). We subsequently looked for *EZH2* expression by real time PCR on the tumor specimens from which NS and AC had been obtained. Results showed that in the 10 snap frozen tumors *EZH2* expression was higher than in normal brain.

We extended investigations on *EZH2* to 57 GBM specimens: this study indicated

that *EZH2* expression is 26.62 ± 19.90 folds higher in GBM than in normal brain. We then analyzed *EZH2* in 9 low grade gliomas (LGG): expression was 4.26 ± 2.90 folds higher than in normal brain, but the value was significantly lower than in GBM ($p=0.0008$). The data suggest that increased expression of *EZH2* is a relevant event during glioma progression.

Increased expression of *EZH2* was also confirmed in high-grade gliomas by immunohistochemistry on 30 gliomas of different grade. This evidence was supported by other investigations performed on 76 case of gliomas of different grade (30 GBM, 20 Anaplastic Astrocytomas, 5 Astrocytomas grade II-III, 9 Astrocytomas grade II, 8 Pilocytic Astrocytomas, 4 Oligoastrocytomas) provided by the University of Brescia. In GBM there was clear-cut nuclear staining heterogeneously distributed to 25-75% *EZH2*-positive cells with frequent overlap to Ki.67/MIB.1 positivity; vessel nuclei were negative.

EZH2 is required for early mouse development (15) and has a pivotal role in preventing the exhaustion of normal stem cells of the hematopoietic system (16). Recent data also show that the PCG proteins EED and *EZH2* engage in a common complex during neurodevelopment, and that upon brain maturation EED associates with the Trithorax group protein MLL(17). Interestingly, increased proliferation of neural progenitor cells due to electroconvulsive treatment, is associated to increased expression of *EZH2* (18). Thus, *EZH2* expression in malignant gliomas is reminiscent of a condition of early CNS development and of neural stem-progenitor cell proliferation, an observation consistent with its role in the maintenance of glioma CSC.

We propose that *EZH2* expression can also be a marker of malignant gliomas, as suggested by converging findings obtained by real time PCR and immunohistochemistry in gliomas of different grade. Future investigations will clarify whether the study of *EZH2* expression can also be of prognostic relevance: this could be of particular interest in low-grade gliomas, as exemplified by our analysis of BT116. These tumors usually occur in young adults and there is a need for novel genetic markers, providing a rationale for decisions on treatment after surgery (19).

The data can be of interest in a therapeutic perspective. The polycomb protein complex EED-*EZH2* interacts closely with histone deacetylase inhibitors (HDAC) (20) and HDAC inhibitors deplete *EZH2* and associated PRC2 proteins in human acute leukemia cells (21). Other reports have shown that the HDAC inhibitor SAHA has anti-glioma properties in vitro and in vivo (22) and a phase II study based on administration of SAHA in patients with malignant gliomas has been completed (23). Assessment of *EZH2* expression could provide one way to stratify patients and define their response in future trials based on HDAC inhibitors.

References

1. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255: 1707-1710.

2. Ahmed S. The culture of neural stem cells. *J Cell Biochem.* 2009; 106: 1-6.
3. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004; 64: 7011-7021.
4. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell.* 2006; 9: 391-403.
5. Rappa G, Mercapide J, Anzanello F, Prasmickaite L, Xi Y, Ju J, et al. Growth of cancer cell lines under stem cell-like conditions has the potential to unveil therapeutic targets. *Exp Cell Res.* 2008; 314: 2110-2122.
6. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007; 58: 267-284.
7. Das S, Srikanth M, Kessler JA. Cancer stem cells and glioma. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008; 4: 427-435.
8. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432: 396-401.
9. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, et al. Stem Cell Marker CD133 Affects Clinical Outcome in Glioma Patients. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 123-9.10.
10. Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna GL, Signore M, Lombardi D, Todaro M, et al. Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 8205-8212.
11. Tunic P, Bissola L, Lualdi E, Pollo B, Cajola L, Broggi G, et al. Genetic alterations and in vivo tumorigenicity of neurospheres derived from an adult glioblastoma. *Mol Cancer.* 2004; 3: 25.
12. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352: 987-996.
13. Pellegatta S, Poliani PL, Corno D, Menghi F, Ghielmetti F, Suarez-Merino B, et al. Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas. *Cancer Res.* 2006;66:10247-10252.
14. Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res.* 2008; 647: 21-29.
15. O'Carroll D, Erhardt S, Paganì M, Barton SC, Surani MA, Jenuwein T. The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 4330-4336.
16. Kamminga LM, Bystrykh LV, de Boer A, Houwer S, Douma J, Weersing E, et al. The Polycomb group gene *Ezh2* prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood.* 2006; 107: 2170-2179.
17. Kim SY, Levenson JM, Korsmeyer S, Sweatt JD, Schumacher A. Developmental regulation of Eed complex composition governs a switch in global histone modification in brain. *J Biol Chem.* 2007; 282: 9962-9972.

18. Gurok U, Loebbert RW, Meyer AH, Mueller R, Schoemaker H, Gross G, et al. Laser capture microdissection and microarray analysis of dividing neural progenitor cells from the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2007; 26: 1079-1090.
19. Brown PD. Low-grade gliomas: the debate continues. *Curr Oncol Rep.* 2006; 8: 71-77.
20. van der Vlag J, Otte AP. Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet.* 1999; 23: 474-478.
21. Fiskus W, Pranpat M, Balasis M, Herger B, Rao R, Chinnaiyan A, et al. Histone deacetylase inhibitors deplete enhancer of zeste 2 and associated polycomb repressive complex 2 proteins in human acute leukemia cells. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5: 3096-3104.
22. Eyupoglu IY, Hahnen E, Buslei R, Siebzehnruhl FA, Savaskan NE, Luders M, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) has potent anti-glioma properties in vitro, ex vivo and in vivo. *J Neurochem.* 2005; 93: 992-999.
23. Galanis E, Jaeckle KA, Maurer MJ, Reid JM, Ames MM, Hardwick JS, et al. Phase II Trial of Vorinostat in Recurrent Glioblastoma Multiforme: A North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol.* 2009.

Marcatori molecolari delle cellule staminali tumorali ed implicazioni clinico-terapeutiche

Massimo Aglietta

Direttore Divisione di Oncologia ed Ematologia, A.O. Ordine Mauriziano, IRCC, Candiolo (TO)

Le attuali terapie per il trattamento dei tumori (chemioterapia, radioterapia, immunoterapia, trattamenti anti-ormonali ed a bersaglio molecolare), mirano ad ottenere una risposta clinica obiettiva eliminando le cellule neoplastiche differenziate e proliferanti. Tuttavia, nonostante gli iniziali incoraggianti successi di questi approcci, le progressioni di malattia rimangono un importante e frequente problema per molte neoplasie.

Tale enigma clinico è attribuito all'esistenza nel tessuto tumorale di un compartimento cellulare identificato con le cellule inizianti il tumore (TIC), comunemente note come cellule tumorali staminali (CSC), resistente *ab initio* alle terapie e che mantiene uno stato di pluripotenza che permette al tumore di rigenerarsi in situ e di dare origine a metastasi a distanza (Figg. 1 e 2).

La chemioresistenza delle TIC dipende dalla preservazione di alcune caratteristi-

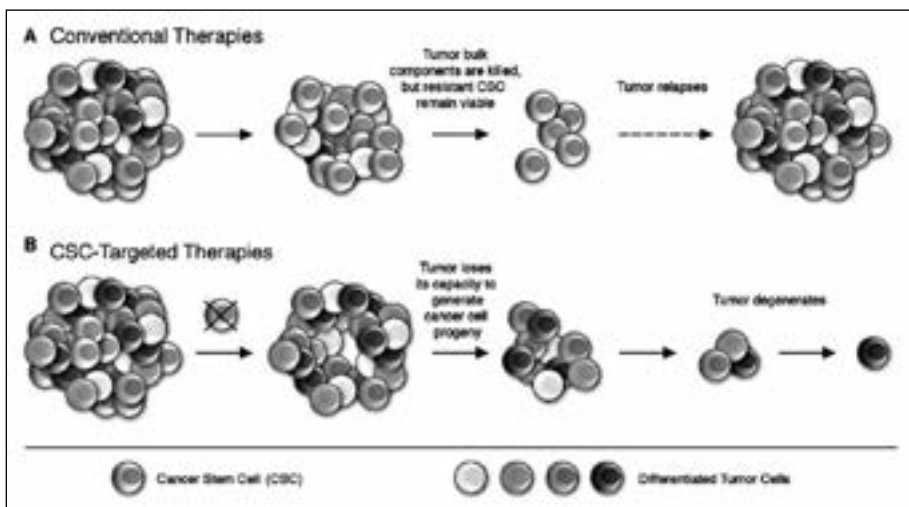


Fig. 1 - Terapie convenzionali versus terapie che hanno come bersaglio le CSC (T BioEssays 31:1038-1049).

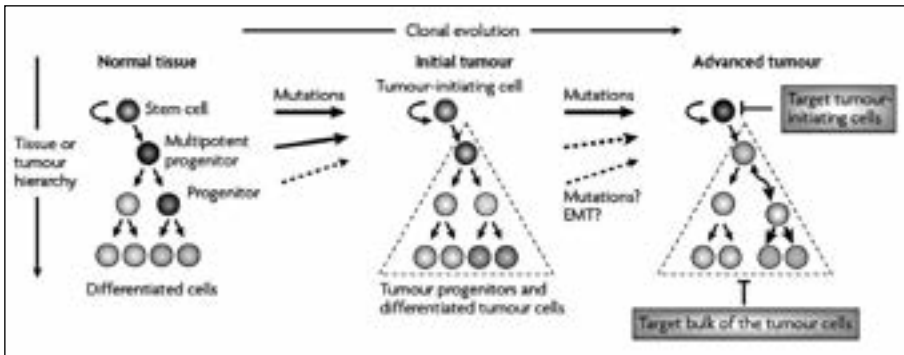


Fig. 2 - Gerarchia tumorale ed evoluzione clonale (Zhou BBS, Nature Reviews Volume 8 , October 2009).

che intrinseche delle cellule staminali, quali l'aumento dell'espressione di pompe ad estrusione, o ad alterazioni del processo apoptotico, del ciclo cellulare o dei meccanismi di riparazione del DNA. L'ipotesi dell'esistenza delle TIC comporta importanti implicazioni nell'ambito delle terapie antitumorali.

In questo nuovo contesto, immaginando il tumore come un insieme di cellule tumorali a vari stadi di differenziazione, da quelle staminali non commissionate a quelle via, via più mature, le strategie terapeutiche devono agire in maniera dinamica: da una parte rallentare la proliferazione e la produzione di cellule tumorali differenziate e aumentare le cellule in apoptosi nel compartimento maturo, dall'altra stimolare la proliferazione delle cellule staminali, dormienti, per aumentarne il pool disponibile e renderlo sensibile agli agenti citotossici.

L'identificazione di caratteristiche specifiche delle TIC potrebbe facilitare lo sviluppo di una nuova generazione di terapie antitumorali che includano le TIC come bersaglio. Le nuove strategie terapeutiche potrebbero pertanto essere basate:

- sull'identificazione di marcatori di superficie contro i quali sviluppare anticorpi monoclonali o inibitori specifici;
- sull'inibizione di vie di trasduzione del segnale intracellulare che regolano l'automantenimento e la sopravvivenza delle TIC.

Marcatori di superficie delle TIC nei tumori solidi

Dati recenti sempre più indicano l'esistenza di TIC in molti tumori solidi.

È stata identificata nel corso degli ultimi anni una serie di marcatori di superficie correlati alle TIC e utilizzati per la loro identificazione e il loro isolamento.

Tali marcatori comprendono il CD133 (anche noto come Prominina 1), il CD44, il CD24, la molecola di adesione delle cellule epiteliali (EpCAM), CD90 (THY1), l'ATP-binding cassette B5 (ABC5). Di molti di questi marcatori tuttavia non è noto il ruolo nel regolare le funzioni delle TIC. Inoltre nessuno di questi marcatori è esclusivamente espresso sulle TIC di tumori solidi, mettendo in risalto l'importanza di identificare marcatori più specifici e rendendo mandatorio l'uso combinato di quelli finora noti per il riconoscimento delle TIC.

CD133 (prominina 1)

Glicoproteina a 5 domini transmembrana con un potenziale ruolo nell'organizzazione topologica della membrana plasmatica, espressa su cellule staminali emopoietiche CD34+ e su progenitori nel fegato fetale, precursori endoteliali, cellule staminali neuronali fetali, epitelio immaturo. Tale marcatore è anche stato correlato alle CSCs. Le CSCs CD133+ presentano generalmente una metilazione minore delle citosine del promotore CpG rispetto alla controparte CD133-. L'espressione di CD133 è regolata epigeneticamente, e una più alta percentuale di CD133+ è stata osservata in seguito ad una esposizione all'inibitore della DNA metiltransferasi decitabina, mentre il trattamento delle cellule CD133- con decitabina o con l'inibitore dell'istone deacetilasi tricostatina A provoca un aumento dell'espressione di CD133 sulla superficie cellulare.

CD44 (PGP1)

Molecola di adesione con numerose isoforme che gioca un ruolo pleiotropico nella trasduzione del segnale, nella migrazione cellulare e nell'homing.

Prospettive ed implicazioni cliniche. Anticorpi monoclonali specifici contro il CD44 sono in fase di sperimentazione preclinica per la terapia della leucemia mieloide acuta (H90) e del carcinoma mammario (P245).

CD24 (HSA)

Molecola di adesione fortemente glicossilata, con un ruolo co-stimolatorio delle cellule B e T, costituisce il solo ligando noto per la P-selectina.

EpCAM (epithelial cell adhesion molecule; ESA, TROP1)

Molecola di adesione omofila Ca²⁺-indipendente, espressa sulla superficie basolaterale della maggior parte delle cellule epiteliali.

Prospettive ed implicazioni cliniche. Adecatumumab, un anticorpo monoclonale specifico contro EPCAM umano è utilizzato in studi clinici di fase II del carcinoma mammario metastatico. Edrecolomab un altro anticorpo monoclonale specifico contro EPCAM è utilizzato in studi clinici di fase II-III nel carcinoma del colon. Catumaxomab, un anticorpo trifunzionale contro EPCAM e CD3 è utilizzato in studi clinici di fase II-III per il trattamento di asciti maligni e nei carcinomi ovarico e gastrico. Infine, MT110, un anticorpo bispecifico a singola catena contro EPCAM e CD3 è in uso in studi clinici di fase I nei carcinomi polmonari e gastrointestinali.

CD90 (THY1)

Glicoproteina di membrane legata ai glicosilfosfatidilinositoli, coinvolta nella trasduzione del segnale e con un ruolo potenziale nella differenziazione delle cellule staminali. È potenzialmente coinvolta anche nell'adesione dei timociti allo stroma timico.

ABCB5

Membri della famiglia delle ATP binding cassette, coinvolte nel trasporto di steroli e altri lipidi. ABCB5 è anche nota come una pompa coinvolta nella resistenza

a molti farmaci (multi-drug resistance, MDR) e conferisce resistenza alla doxorubicina. L'espressione di queste pompe identifica una popolazione caratteristica nota come Side population (SP) sulla base della capacità di queste cellule di pompare attivamente un colorante vitale, l'Hoechst33342, fuori dalla cellula. L'ABCB5 è inibita dal verapamil.

Prospettive ed implicazioni cliniche. La somministrazione sistemica di anticorpi monoclonali diretti (3C2-1D12) contro ABCB5 ha dimostrato di ridurre significativamente la crescita tumorale e la frequenza di formazione di tumore in un modello di xenotrapianto di melanoma, rivelando un'azione sulle cellule inizianti il melanoma maligno.

ALDH1

La famiglia ubiquitaria delle aldeidi deidrogenasi (ALDH) catalizza la reazione enzimatica di ossidazione delle aldeidi alifatiche ed aromatiche a acidi carbossilici. L'ALDH1 nello specifico ha un ruolo nella conversione del retinolo ad acido retinoico, importante per la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza delle cellule. Inoltre l'incremento dell'attività di ALDH1 media la resistenza alla ciclofosamide.

Recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) (ERBB2)

L'attivazione dei membri della famiglia di EGFR porta all'attivazione di vie di segnalazione implicate nella sopravvivenza e proliferazione cellulare. Diversi studi hanno messo in evidenza il ruolo di EGFR nell'autorinnovamento e nella proliferazione cellulare di TIC e cellule SP in diversi tumori solidi. Inoltre un inibitore di EGFR quali il gefitinib riduce significativamente l'efficienza di formazione di mammosfere (MFE).

Prospettive ed implicazioni cliniche. Numerosi recenti studi hanno dimostrato che l'efficacia in termini di sopravvivenza del trastuzumab, (Herceptin, Genentech/Roche), un anticorpo monoclonale specifico per il recettore tirosin cinasico ErbB2 (Her2), potrebbe essere correlata alla sua capacità di colpire le TIC del carcinoma mammario. Tuttavia la maggior parte dei pazienti sviluppa resistenza al trastuzumab entro un anno, il che lascia ipotizzare che le TIC siano dotate di

Tab. 1 - Marcatori di superficie delle TIC come potenziali bersagli terapeutici.

Bersaglio	Anticorpo	Tumore indicato	Fase di sperimentazione
ABCB5	3C2-1D12	Melanoma	Preclinica
CD44	H90 P245	Leucemia mieloide acuta, carcinoma mammario	Preclinica
EPCAM	Adecatumumab	Carcinoma mammario metastatico	Fase 2
	Ercolomab	Tumore del colon	Fase 2/3
	Catumaxomab, diretto contro EPCAM e CD3	Carcinoma gastrico ed ovarico	Fase 2/3
	MT110, diretto contro EPCAM e CD3	Carcinoma polmonare e gastrointestinale	Fase 1
ErbB2	Trastuzumab	Carcinoma mammario	
EGFR	Gefitinib	Carcinoma mammario	

ABCB5: ATP-binding cassette sub-family member 5; EPCAM: molecole di adesione delle cellule epiteliali.

una plasticità genetica e/o epigenetica che consente loro di acquisire nuovi caratteri che favoriscono la progressione tumorale e la resistenza alla terapia.

Si può quindi supporre che l'efficacia clinica degli inibitori di EGFR possa essere dovuta ad un'espressione dei membri della via di EGFR nelle CSC "residenti". Nella tabella 1 sono elencati i principali anticorpi o inibitori sviluppati e diretti contro molecole di superficie delle TIC in fase di sperimentazione preclinica e clinica o di corrente uso clinico.

Vie di trasduzione del segnale (attive) nelle cellule staminali del cancro.

Le vie di trasduzione del segnale all'automantenimento preposte alla proliferazione nelle cellule staminali sembrano le medesime coinvolte nel processo di tumorigenesi e crescita tumorale quando deregolate. Tutte queste molecole o le vie in cui sono coinvolte possono rappresentare potenziali e attraenti bersagli terapeutici per eradicare la componente staminale del tumore.

I programmi di automantenimento delle cellule staminali normali vedono coinvolte le vie di trasduzione del segnale di Wnt, Notch, Sonic Hedgehog e la proteina ossea morfogenetica 1 (BMP1).

Alternativamente, anche prodotti di geni oncosoppressori che inibiscono la proliferazione tumorale o regolano le risposte cellulari al danno al DNA, quali p53, PTEN, INK4A e ARF, possono bloccare l'automantenimento delle cellule staminali. Gli esatti pathways attivi nelle cellule staminali del cancro (CSCs) nei tumori solidi non sono ancora noti.

Notch

La via di segnalazione di Notch gioca un ruolo importante nella differenziazione cellulare durante le fasi precoci dello sviluppo embrionale e nell'età adulta, ma sostiene anche la crescita delle cellule tumorigeniche in vari tipi di tumori solidi.

Prospettive ed implicazioni cliniche. L'uso di un inibitore di Notch, l'enzima γ -secretasi, riduce il numero delle cellule tumorigeniche senza influenzare la crescita delle cellule più differenziate, non tumorigeniche. Inoltre la capacità di formare mammosfere da parte di cellule carcinoma duttale in situ è ridotta dall'uso della γ secretasi o da anticorpi neutralizzanti Notch. Sono stati sviluppati inibitori della γ -secretasi, quali MK-0752 e il DBZ per l'utilizzo in protocolli clinici di fase I nel glioblastoma, medulloblastoma, carcinoma mammario in fase avanzata e per studi preclinici nell'adenoma intestinale rispettivamente. Inoltre è in fase di validazione preclinica un anticopro monoclonale, DLL4, in tumori solidi.

PI3K/AKT

Anomalie nella via di segnalazione che coinvolge la PI3K e il suo principale effettore, la cinasi AKT sono state osservate in molti tipi tumorali, di cui promuove la proliferazione, angiogenesi e invasione.

Prospettive ed implicazioni cliniche. In vari studi le CSCs si sono dimostrate più sensibili all'analogo del fosfatidilinositolo, il SH-6, rispetto alla controparte popolazione tumorale non staminale. Un effetto analogo è ottenuto con l'inibitore

di PI3K LY290042. Una serie di inibitori di PI3K e Akt è in fase di validazione clinica in protocolli di fase I e II nel linfoma, mieloma multiplo, melanoma, leucemia, nei tumori mammari, ovarici, del colon retto, e altri tumori solidi. Inibitori di PI3K con struttura nota includono la tienopirimidina GDC-0941, la imidazo-chinazolina e BEZ-235 e la viridiana sintetica PX-866; tra gli inibitori di Akt sono inclusi invece un derivato dell'alchilfosfocolina eterociclica, la perifosina e l'oligonucleotide antisense 20-mer, RX-0201.

Sonic Hedgehog (SHH)

La famiglia dei geni Sonic Hedgehog (Hh) gioca un ruolo cruciale nella proliferazione e differenziazione delle cellule staminali durante l'embriogenesi e nella regolazione della divisione cellulare nel compartimento staminale nell'organismo adulto. Mutazioni a carico dei geni Hh, che inducono un'attivazione anomala della loro via di segnalazione, sono state identificate in una serie di tumori solidi.

Prospettive ed implicazioni cliniche. Il trattamento con ciclopamina, un inibitore della via di segnalazione di Hh, porta alla riduzione della formazione di neurosfere derivate da colture primarie o da linee cellulari di glioblastoma e aumenta la radiosensibilità delle cellule stesse riducendone anche la proliferazione.

Piccole molecole antagoniste di Hh, molte delle quali antagonizzano con la molecola transmembrana della famiglia, Smoothed, sono in fase di sperimentazione in protocolli clinici di fase I e II. Tra questi vengono incluse i derivati della ciclopamina GDC-0449 e IPI-926.

Wnt/ β -catenina

La via di segnalazione di Wnt/ β -catenina è implicato in processi di automantenimento nelle TIC in molte neoplasie quali la leucemia mieloide cronica (CML) e il carcinoma gastrico.

Prospettive ed implicazioni cliniche. Sono stati quindi sviluppati inibitori di Wnt e di effettori coinvolti nella via del segnale di Wnt che sono in via di sperimentazione preclinica nel melanoma, nel tumore del colon retto e nel carcinoma polmonare non a piccole cellule. Piccole molecole inibitrici del segnale Wnt, quali ZTM000990 e PKF118-310, sono in fase di validazione preclinica.

BMPs

Le molecole appartenenti alla via del segnale di BMP sono importanti per il destino delle cellule staminali. In vitro la somministrazione di BMP ha un effetto citostatico sulle CSC (CD133+) ottenute da linee cellulari o tessuti di glioblastoma e ne riduce la capacità di dare tumore in xenotrapianti. Una riduzione del segnale mediato da BMP nelle CSC di glioblastoma può essere correlato ad un silenziamento epigenetico dell'espressione del recettore di BMP (ipermetilazione del DNA), mentre un'espressione forzata del recettore può portare alla perdita di tumorigenicità delle CSC. Il silenziamento epigenetico attraverso la metilazione del DNA potrebbe essere quindi la causa di una diminuita attivazione della via di BMP, e una conseguente riduzione della differenziazione nelle CSC. Una demetilazione selettiva di particolari promotori, quali il recettore BMP, può portare ad

una diminuzione del pool di CSC dovuto ad un aumento della differenziazione di queste cellule. Nella tabella 2 sono elencati i principali inibitori di vie di segnalazione coinvolte nel processo di automantenimento delle TIC in fase di sperimentazione preclinica e clinica.

Tab. 2 - Potenziali inibitori delle cellule staminali tumorali in fase di sperimentazione preclinica e clinica.

Bersaglio	Anticorpo	Tumore indicato	Fase di sperimentazione
Notch	DBZ, inibitore di γ -secretasi	Adenoma intestinale	Preclinica
	MK-0752, a γ -secretase inhibitor	T-ALL e carcinoma mammario avanzato o metastatico	Fase 1
	R4733 DLL4-anticorpo monoclonale	Tumori solidi Tumori solidi	Fase 1/2 Preclinica
P13K	XL-147	NSCLC, linfoma, carcinoma ovarico, mammario, dell'endometrio e della cute	Fase 1/2
	GDC-0941 PX-866 CAL-101	Tumori solidi	Fase 1
	BGT-226 BEZ-235	Leucemia, linfoma, mieloma multiplo Carcinoma mammario	Fase 1/2 Fase 1/2
		Carcinoma mammario, del colon retto, del polmone, CNS, GIST, linfoma melanoma	Fase 1/2
AKT	Perifosina	Leucemia, linfoma, GIST, sarcoma, carcinoma renale ovarico, prostatico, polmonare, mammario, coloretale, testicolo, mieloma multiplo, NSCLC GBM	Fase 1/3
	VEL-015 Triciribina	Carcinoma prostatico Leucemia, mieloma multiplo, NSCLC, carcinoma mammario, coloretale, ovarico, pancreatico, melanoma	Fase 1 Fase 1/2
	RX-0201	Carcinoma renale	Fase 2/3
Hedgehog	5E1, anticorpo neutralizzante Hh Ciclopamina	Carcinoma esofageo, prostatico e medulloblastoma Tumori solidi	Preclinica Preclinica
	GDC-0449	Carcinoma cellulo-basale e del colon retto metastatico	Fase 1 Fase 2
	IPI-926	Tumori solidi metastatici o in fase avanzata	Fase 1
	BMS-833923/ XL-139	Tumori cutanei	Fase 1
Wnt/ β -catenina	WNT2- anticorpo specifico	Melanoma e NSCLC	Preclinica
	TCF-b-catenin inhibitors	Tumore del colon	Preclinica
	ZTM000990 PKF118-310	Tumori solidi	Preclinica

Il microambiente delle CSC

Il microambiente stromale del tumore come bersaglio terapeutico è stato rappresenta un approccio ulteriore per eradicare CSC. In maniera non sorprendente, le CSC sembrano sensibili alle condizioni che si trovano nell'ambiente locale, includendo la vascolarizzazione tumorale e il livello locale di citochine e chemocine.

INTERLEUCHINA-4 (IL-4)

Nel carcinoma colon-rettale, la produzione paracrina o autocrina di citochine infiammatorie quali IL-4 è associata a una forma di tumore più aggressivo e a resistenza alla chemioterapia delle CSCs.

Prospettive ed implicazioni cliniche. Un anticorpo specifico contro l'IL-4 ha dimostrato di ridurre la vitalità sia delle CSCs che delle cellule non-tumorigeniche e di aumentare l'efficacia della chemioterapia suggerendo che l'anticorpo sia in grado di rendere sensibili le TIC alle terapie citotossiche.

CXCR4

CSCs di carcinoma del pancreas e del colon che coesprimono il recettore di chemocine CXCR4 (CXCR4+/CD133+) presentano un fenotipo più aggressivo.

Prospettive ed implicazioni cliniche. L'utilizzo di inibitori di CXCR4 quali AMD3100 non ha mostrato efficacia sulla crescita del tumore in modelli animali di xenotrapianto, ma previene la formazione di metastasi polmonari.

Angiogenesi

La crescita di sfere tumorali in modelli di xenotrapianto è significativamente influenzata dalla vascolarizzazione tumorale in vivo. In studi di xenograft di glioma in topi immunodeficienti la combinazione di chemioterapia e terapia anti-angiogenetica si evidenzia una diminuzione della massa tumorale imputabile all'azione del bevacizumab sulle CSC di glioblastoma.

Bibliografia essenziale

1. Schatton T, Frank NY, Frank MH. Identification and targeting of cancer stem cells. *Bioessays*. 2009 Oct; 31(10): 1038-49. Review.
2. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008 Oct; 8(10):755-68. Epub 2008 Sep 11. Review.
3. Winkquist RJ, Boucher DM, Wood M, Furey BF. Targeting cancer stem cells for more effective therapies: Taking out cancer's locomotive engine. *Biochem Pharmacol*. 2009 Aug 15; 78(4): 326-34. Epub 2009 Apr 1.
4. Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Oct; 8(10): 806-23. Review.

Come il paradigma di cellula staminale tumorale (e sua nicchia) indirizza la strategia terapeutica nella cura dei tumori

Maurizio D'Incalci

Dipartimento di Oncologia, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano

Un crescente numero di evidenze sostiene l'ipotesi che la bassa curabilità dei tumori umani avanzati con le terapie farmacologiche disponibili sia attribuibile alla resistenza delle cellule "staminali tumorali".

Nella lezione si analizzeranno le conoscenze disponibili sui meccanismi di resistenza ai farmaci antitumorali, con particolare riferimento a quelli per i quali vi siano evidenze che riguardano la resistenza delle cellule "staminali tumorali" umane.

Si introdurrà l'argomento della resistenza analizzando i meccanismi più generali che riguardano la farmacocinetica sistemica e cellulare e in cui l'aspetto rilevante è il mancato raggiungimento di un livello di farmaco all'interno delle cellule tumorali che è attivo.

Su questo punto, soprattutto per quanto riguarda la ritenzione di farmaci all'interno delle cellule tumorali si sono accumulate negli ultimi anni moltissime conoscenze molecolari che riguardano l'espressione di glicoproteine implicate nel trasporto dei farmaci che regolano il loro uptake ed efflusso.

Per le diverse classi di farmaci antitumorali si analizzeranno quali siano i principali meccanismi di resistenza. Per i farmaci che danneggiano il DNA i meccanismi di riparazione sono presumibilmente coinvolti nella resistenza. Tali meccanismi sono oggi conosciuti a livello molecolare e nella lezione saranno descritti nel dettaglio con esempi che riguardano principalmente i farmaci antitumorali.

Per alcuni farmaci utilizzati in clinica diretti ad inibire dei target molecolari specifici (es. inibitori di tirosine-chinasi) esistono evidenze che delle alterazioni molecolari (es. mutazioni) possono essere alla base della bassa sensibilità del target stesso o di pathways coinvolti nelle risposte cellulari successive alla interazione del farmaco con il target molecolare. Anche su questo punto si faranno degli esempi che riguardano farmaci utilizzati già in clinica che sono stati sviluppati negli ultimi anni e per i quali esistono molte conoscenze sui meccanismi molecolari di resistenza.

Infine si discuterà come le conoscenze e le metodiche per l'impiego delle cellule "staminali tumorali" potranno essere affiancate ai modelli sperimentali che sono

stati utilizzati fino ad oggi per la scoperta e lo sviluppo di nuovi antitumorali per tentare di selezionare molecole che siano selettivamente più efficaci contro le popolazioni cellulari del tumore che sono più rilevanti per l'evoluzione clinica della malattia.

Bibliografia essenziale

1. Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer*. 2010; 10: 147-156.
2. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J. Mammary Gland. Biol Neoplasia*. 2009; 14: 3-9.
3. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*. 2008; 8: 755-768.
4. Zhou BS, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. 2009; 8: 806-823.
5. Dalerba P, Clarke MF. Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory. *Cell Stem Cell*. 2007; 1: 241-242.
6. Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Larocca LM, Peschle C, De Maria R. Letter to the Editor: Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death and Differentiation*. 2006; 13: 1238-1241.
7. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/ β -catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *PNAS*. 2007; 104 (2): 618-623.
8. Türk D, Hall MD, Chu BF, Ludwig JA, Fales HM, Gottesman MM, Szakács G. Identification of compounds selectively killing multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res*. 2009; 69 (21): 8293-8301.

