

Alma Mater Studiorum
Università degli Studi di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA
IN
SCIENZE BIOMEDICHE**

XXVI Ciclo

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15- Malattie del Sangue
Settore Concorsuale di afferenza: 06/D3 Malattie del sangue, Oncologia e Reumatologia

**LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE E
SIGNALING PURINERGICO:
POSSIBILI SVILUPPI TERAPEUTICI**

Relatore:

Presentata da:

Dr.ssa
LUCIA CATANI

Dr.ssa
VALENTINA SALVESTRINI

Coordinatore del corso di Dottorato:
Prof. LUCIO COCCO

Esame finale anno 2014

Indice

SOMMARIO	7
INTRODUZIONE	
I. SISTEMA EMOPOIETICO	
1. L'emopoiesi	10
2. La cellula staminale	14
3. La nicchia	16
II. LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	
1. La leucemia mieloide acuta	19
2. La cellula staminale leucemica	23
3. La nicchia leucemica	28
III. NUCLEOTIDI EXTRACELLULARI E RECETTORI P2	
1. I nucleotidi ATP e UTP	31
2. I recettori purinergici	33
3. Signaling purinergico e sistema emopoietico	36
4. Signaling purinergico e cancro	38
MATERIALI E METODI	
1. Cellule	43
2. Arricchimento di progenitori emopoietici normali CD34+ mediante separazione immunomagnetica	45
3. Isolamento di cellule staminali leucemiche mediante cell sorting	46
4. Quantificazione dell'espressione dell'mRNA dei P2R mediante Real-time qRT-PCR	47

5. Analisi degli ioni Calcio intracitoplasmatici	51
6. Studi di microarrays	52
7. Saggi clonogenici	53
8. Saggi di proliferazione	54
9. Apoptosi	55
10. Ciclo cellulare	56
11. Saggi di migrazione	57
12. Esperimenti di xenotrapianto	58
13. Analisi statistica dei dati	62

RISULTATI

1. Le cellule leucemiche di LAM esprimono i recettori purinergici P2	64
2. I recettori P2 espressi dalle cellule di LAM sono funzionalmente attivi	66
3. GEP di cellule leucemiche trattate con ATP	69
4. L'ATP inibisce la proliferazione e la capacità clonogenica di cellule leucemiche	81
5. L'ATP esplica la sua funzione anti-proliferativa e pro-apoptica attivando il recettore P2X7	86
6. Effetto inibitorio dei nucleotidi trifosfato sulla migrazione in vitro di cellule di LAM	90
7. I nucleotidi trifosfato inibiscono la capacità di homing ed engraftment delle cellule di LAM in topi immunocompromessi	94

8. Utilizzo farmacologico dell'ATP in vivo	97
DISCUSSIONE	101
BIBLIOGRAFIA	110

Sommario

I nucleotidi trifosfato sono, dal punto di vista evoluzionistico, tra le molecole più antiche e conservate tra le specie. Oltre al ruolo cruciale che ricoprono in alcune fondamentali funzioni cellulari come la sintesi degli acidi nucleici e il metabolismo energetico della cellula, negli ultimi trenta anni è emerso sempre di più il loro coinvolgimento nella regolazione di numerose funzioni cellulari. Questi importanti mediatori cellulari sono presenti nel microambiente e cambiamenti nella loro concentrazione extracellulare possono modulare in maniera differenziale vari tipi cellulari. Ad esempio, i nucleotidi trifosfato ATP e UTP, presenti nel microambiente midollare, sono dei potenti stimolatori dei progenitori emopoietici. Essi stimolano la proliferazione e l'attecchimento delle cellule staminali emopoietiche, così come la loro capacità migratoria, attraverso l'attivazione di specifici recettori di membrana, i recettori purinergici (P2R). In questo studio abbiamo dimostrato che i nucleotidi ATP e UTP esercitano un effetto diametralmente opposto sul compartimento staminale leucemico di leucemia acuta mieloide (LAM). Abbiamo dimostrato che le cellule leucemiche esprimono i recettori P2 e che questi sono funzionalmente attivi. Studi di microarray hanno evidenziato che, a differenza di ciò che avviene nelle CD34⁺, la stimolazione di cellule leucemiche con ATP induce la down-regolazione dei geni coinvolti nella proliferazione e nella migrazione, mentre up-regola geni inibitori del ciclo cellulare. Abbiamo poi confermato a livello funzionale, mediante test *in vitro*, gli effetti osservati a livello molecolare. Studi di inibizione farmacologica, ci hanno permesso di capire che l'attività inibitoria dell'ATP

sulla proliferazione si esplica attraverso l'attivazione del recettore P2X7, mentre i sottotipi recettoriali P2 prevalentemente coinvolti nella regolazione della migrazione sono i recettori P2Y2 e P2Y4. Esperimenti di xenotrapianto, hanno evidenziato che l'esposizione ad ATP e UTP sia dei blasti leucemici sia delle cellule staminali leucemiche CD38-CD34⁺ diminuisce la loro capacità di homing e di engraftment nel midollo di topi immunocompromessi. Inoltre, il trattamento farmacologico con ATP, di topi ai quali è stata indotta una leucemia umana, ha diminuito lo sviluppo della leucemia *in vivo*.

Nel complesso i dati riportati in questo studio dimostrano la capacità dei nucleotidi ATP e UTP di modulare la funzionalità cellulare di cellule di LAM. In particolare, l'attivazione del signaling purinergico da parte di ATP e UTP, a differenza di ciò che accade nelle CD34⁺ normali, inibisce la proliferazione, la migrazione e l'attecchimento *in vivo*. Questo ci porta a pensare che la modulazione farmacologica del signaling purinergico possa rappresentare un buon punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Introduzione

I. IL SISTEMA EMOPOIETICO

1. L'emopoiesi

L'emopoiesi è il processo attraverso il quale hanno origine progenitori maturi e cellule differenziate dei vari lineage differenziativi mieloide, eritroide, megacariocitario e linfoide, a partire da una popolazione di cellule staminali capostipiti. Il sistema emopoietico è un sistema altamente gerarchizzato, con differenti progenitori *committed* dotati di differenti capacità proliferative e differenziative (vedi figura 1).

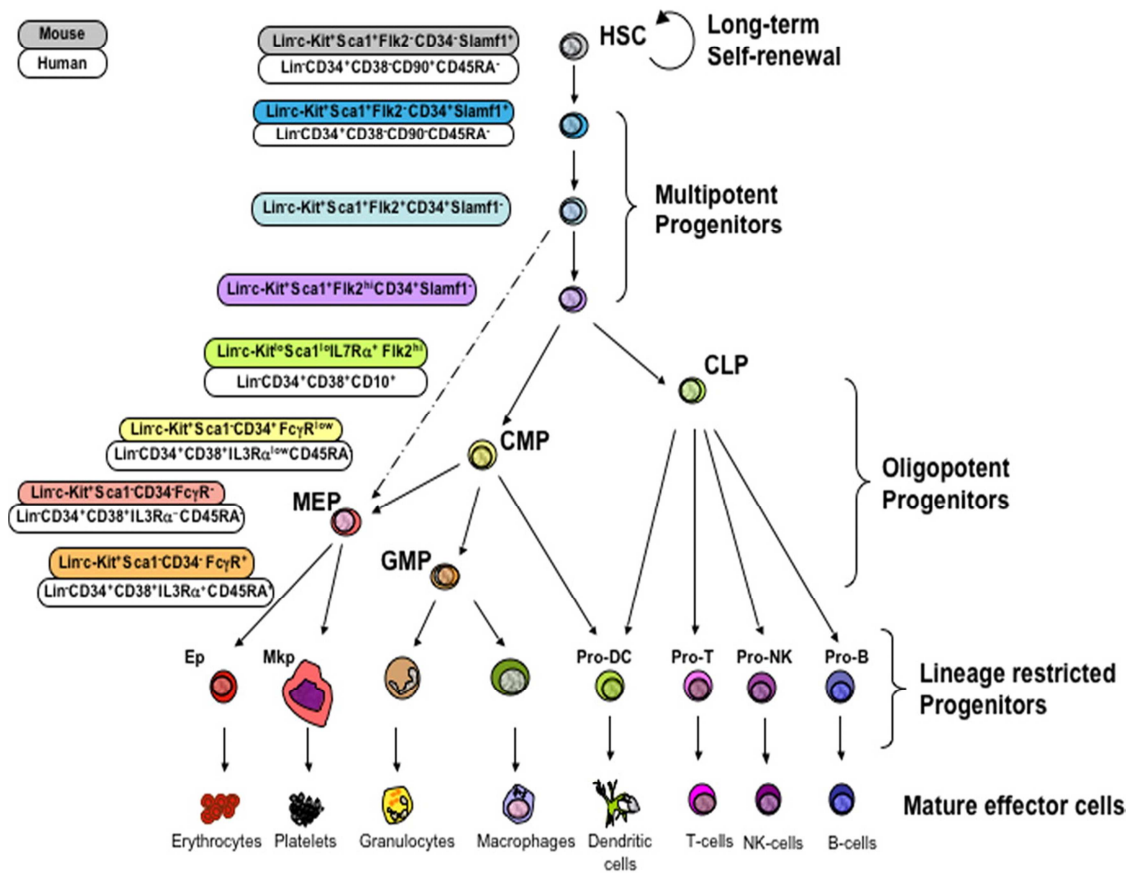


Figura 1. Albero differenziativo delle cellule emopoietiche

Il costante processo di rinnovamento cellulare è assicurato dalla capacità delle cellule staminali di automantenersi e differenziare. Il self-renewal è una caratteristica fondamentale e indispensabile per impedire l'esaurimento del compartimento staminale nel tempo ed è basato sulla capacità di ciascuna cellula staminale di dividersi dando origine a due cellule figlie. Di queste, una rimpiazza la cellula madre, l'altra va incontro a differenziamento e maturazione. La combinazione di capacità proliferativa e differenziativa delle cellule staminali emopoietiche è finalizzata allo sviluppo di cellule con potenzialità differenziativa e maturativa sempre più ristretta. Questo processo porta alla produzione di un gran numero di cellule emopoietiche mature e funzionalmente specializzate che dal midollo osseo vengono, infine, immesse in circolo [1]. Anche se il meccanismo che regola il self-renewal non è ancora stato del tutto chiarito, questo processo appare finemente regolato affinché, in condizioni di *steady-state*, il numero di CSE sia mantenuto costante. Allo stesso modo, in condizioni di necessità come in caso di un trapianto oppure di emorragia, questo sistema si fa sì che, per un breve periodo, le cellule staminali si espandano in maniera esponenziale, per poi ritornare ai livelli basali. Diventa evidente che una deregolazione di questi meccanismi sia alla base del processo neoplastico.

Come indicato in figura 1, le CSE possono generare, mediante il fenomeno del commissionamento, progenitori multipotenti CMP (common myeloid progenitor) e CLP (common lymphoid progenitor) documentati nel topo.

Scendendo dalla CSE ai progenitori multilinea le cellule assumono potenzialità differenziative più ristrette, parallelamente decrescono le capacità di autorinnovamento, mentre aumenta l'espansione clonale a seguito di divisioni cellulari maturative. Secondo la teoria attualmente accettata, l'eterogeneità del compartimento staminale è il risultato di stimoli intrinseci ed estrinseci che influenzano la cellula staminale emopoietica nella scelta di auto-replicarsi, differenziare, maturare. Possiamo considerare fattori estrinseci gli stimoli ambientali (quali fattori umorali, chemochine, molecole di adesione e fattori di crescita), prodotti dallo stroma midollare. Vi sono poi meccanismi intrinseci alla cellula staminale stessa, in grado di generare variabilità attraverso diversi programmi genici, generati in modo casuale, ad ogni divisione cellulare. Quando la CSE è indotta a differenziare, vengono inibiti i geni che regolano il self-renewal e contemporaneamente up-regolati i geni preposti all'acquisizione di determinate identità funzionali.

Per quanto riguarda le citochine che regolano i vari livelli differenziativi (vedi figura 2), si possono distinguere tre categorie:

- 1) i fattori specifici per una linea maturativa, in grado di stimolare una cellula già commissionata inducendone proliferazione e stimolando le proprietà funzionali della cellula terminalmente differenziata (EPO, M-CSF, IL-5);
- 2) I fattori linea non-specifici, cioè quelli che agiscono su progenitori emopoietici di livello intermedio (G-CSF, IL-3, IL-4, GM-CSF);
- 3) fattori che inducono il

reclutamento nel ciclo cellulare dei progenitori più primitivi (IL-6, IL-11, IL-12, FLT-3, SCF).

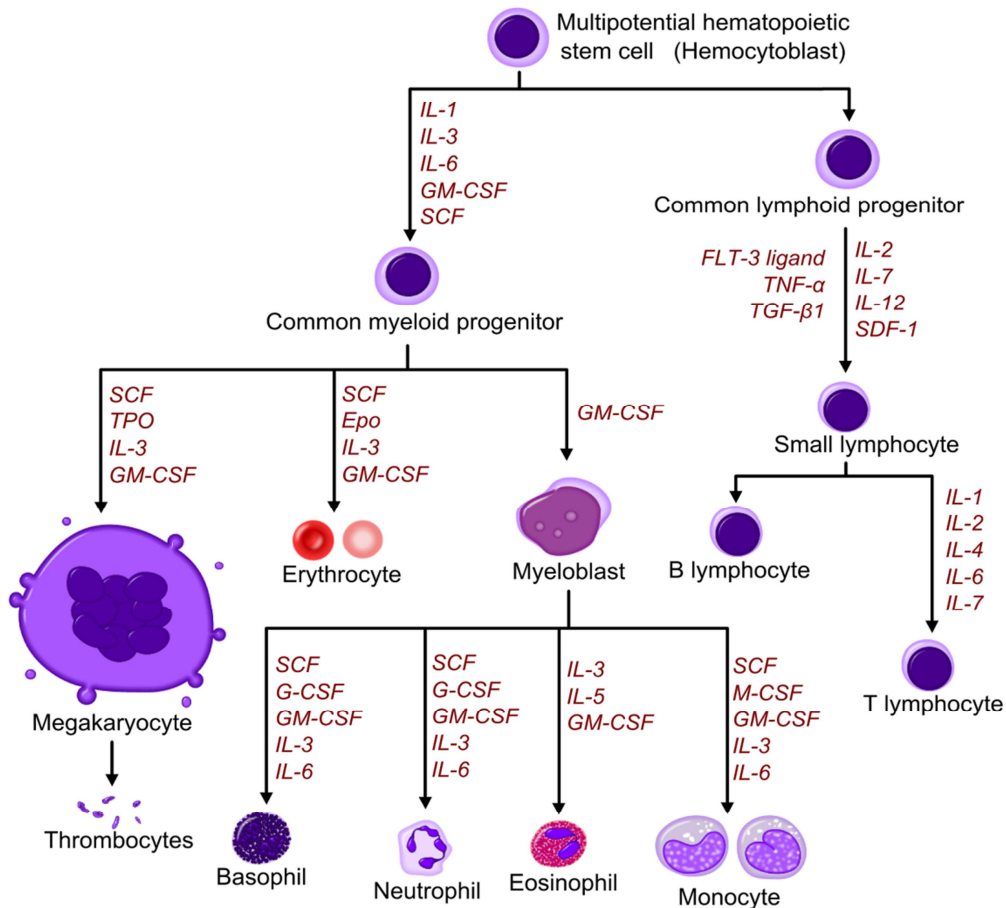


Figura 2. Citochine che agiscono ai vari livelli dell'emopoiesi

La crescita dei progenitori emopoietici dipende anche da fattori a regolazione negativa, tra questi sono compresi il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), le prostaglandine, il fattore di trasformazione neoplastica- β (TGF- β) e gli interferoni (INFs) [1].

2. La cellula staminale

Uno dei maggiori ostacoli allo studio della biologia delle cellule staminali emopoietiche è rappresentato dall'estrema "rarietà" di questa popolazione; nel midollo umano, soltanto una cellula su un milione è effettivamente una CSE trapiantabile. Inoltre la morfologia tipica di cellule immature e indifferenziate ne rende particolarmente difficile l'isolamento.

L'introduzione di saggi clonogenici in metilcellulosa (CFC, Colony Forming cells) e saggi di crescita delle LTC-IC (Long Term Culture-Initiating Cell), hanno permesso di confermare l'esistenza e di caratterizzare meglio le funzionalità delle CSE.

Lo sviluppo della citofluorimetria a flusso combinata alle tecniche di isolamento immunomagnetico hanno permesso di caratterizzare fenotipicamente il compartimento staminale. La purificazione di CSE richiede l'esclusione di marker specifici di ogni lineage differenziativo (CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b, GlyA), in combinazione con l'espressione di altre molecole di superficie, prime fra tutti il CD34 e il CD38. Negli anni altri marcatori sono stati proposti per la caratterizzazione delle CSE: il Thy-1 (CD90), il CD45RA, CD123, CD133, c-Kit. Attualmente in letteratura, è comunemente accettato che la CSE umana sia caratterizzata dalla positività per il CD34, non esprima i marker di comminssionamento e sia negativa per l'espressione del CD38, del CD45RA e del CD123 (Lin-CD123-CD38-CD34+).

Un altro approccio per la caratterizzazione funzionale della CSE è l'utilizzo di saggi *in vivo* che permettano una valutazione della capacità della CSE di ricostituire l'emopoiesi in un ospite immunocompromesso [2]. Sono passati più di venti anni dalla prima volta in cui cellule emopoietiche primarie sono state trapiantate in topi immunocompromessi e sostanziali miglioramenti sono stati apportati. Ad oggi, il gruppo di Dick ha dimostrato di essere in grado di effettuare trapianti di una singola CSE [3]. Tuttavia, è importante ricordare che i modelli di xenotrapianto sono soltanto dei surrogati e come il comportamento nel modello murino correla con ciò che accade nell'uomo resta tutto da chiarire. Grazie soprattutto all'utilizzo di modelli murini, verso la fine degli anni novanta, è stata individuata una popolazione staminale caratterizzata dall'assenza dell'antigene CD34 in grado di ripopolare l'emopoiesi se trapiantata in topi immunodepressi [4]. La relazione tra la popolazione CD34⁺ e la popolazione CD34⁻ non è ancora stata del tutto chiarita, al momento l'ipotesi più accreditata è quella proposta da Sato [5] secondo cui l'espressione del CD34 correla con lo stato funzionale della cellula staminale. La frazione CD34⁻ potrebbe contenere cellule staminali quiescenti che, una volta attivate, acquisiscono l'espressione dell'antigene CD34. Secondo questo modello, oltre ad essere dotate della capacità di ricostituire l'emopoiesi e differenziare, le cellule staminali sono in grado di regredire ad uno stato di quiescenza, associato ad una perdita di espressione dell'antigene CD34 [6] [7].

2. La nicchia emopoietica

In età post-natale, il midollo osseo è la sede elettiva dell'emopoiesi. Il midollo è una struttura complessa costituita dalle cellule emopoietiche, da cellule adipose e da un complesso sistema cellulare (fibroblasti, macrofagi, cellule endoteliali, cellule avventiziali, fibre nervose) ed extracellulare (collagene, glicoproteine di adesione, proteoglicani) che prende il nome di microambiente midollare. La funzione di quest'ultimo è sia di supporto alle cellule emopoietiche, che sono ancorate alle cellule stromali e alla matrice extracellulare attraverso un complesso sistema di molecole di adesione, che di regolazione della proliferazione e differenziazione dei progenitori emopoietici. Ciò avviene attraverso la secrezione ad opera delle cellule stromali di fattori di stimolazione [1] e di inibizione, come pure attraverso lo stabilirsi di interazioni dirette cellula-cellula o cellula-matrice extracellulare.

Studi funzionali hanno suggerito che le cellule staminali risiedono all'interno del midollo secondo una distribuzione spaziale non random; andando ad occupare quella che viene chiamata la *nicchia* staminale.

Il concetto di nicchia nasce negli anni settanta con i lavori di Schofield [8], per poi essere confermato successivamente da vari studi anatomici sulla distribuzione delle CSE nelle cavità midollari [9] [10]. Questa compartimentalizzazione anatomica è stata meglio descritta negli ultimi anni grazie a studi in vivo sull'homing, che hanno dimostrato la localizzazione a

livello dell'endosteo delle cellule immature (nicchia endostale), sia post-mortem che in vita, mentre le cellule in più differenziate o prossime alla maturazione finale sembrano risiedere in posizioni più distali (nicchia perivascolare) [11]. Tuttavia, ad oggi, una precisa localizzazione fisica e caratterizzazione funzionale della nicchia staminale resta ancora da ottimizzare, principalmente a causa delle difficoltà tecniche associate all'imaging in vivo a livello delle ossa lunghe.

L'endosteo, punto di contatto tra tessuto emopoietico e osso, sembra ricoprire un ruolo fondamentale nella regolazione delle CSE. Vari studi hanno dimostrato il coinvolgimento attivo degli osteoblasti nella regolazione dell'emopoiesi, in particolare nel supportare la capacità di ricostituzione a lungo termine delle CSE così come nella regolazione dell'adesione cellulare e dell'homing. E' stato dimostrato che anche le cellule staminali mesenchimali (MSC), cellule stromali multipotenti dalle quali originano gli osteoblasti, giocano un ruolo importante nella regolazione della nicchia staminale. Studi in modelli murini, hanno dimostrato che il co-trapianto di MSC con CSE incrementa l'attecchimento e il self-renewal delle CSE. Recentemente, è stato anche descritto il ruolo chiave di cellule MSC secernenti CXCL-12 nella regolazione dell'homing midollare delle CSE e nel loro supporto. Il CXCL-12 è una chemochina costitutivamente espressa da numerose cellule stromali, e ricopre un ruolo fondamentale per il mantenimento della quiescenza delle CSE e per il loro mantenimento a livello midollare. Le CSE sono in grado di

mobilizzare continuamente da e verso il midollo e la loro mobilitazione dipende dai livelli di CXCL-12 il quale si lega al recettore CXCR4 espresso dalle CSE stesse. In seguito all'interazione di CXCL12 con il proprio recettore, si assiste alla stimolazione dei legami LFA-1/ICAM-1 e VLA-4/VCAM-1, che mediano interazioni e adesioni più forti, arrestando le cellule staminali.

Oltre alla componente cellulare, altri fattori fisiologici regolano la nicchia staminale. Un modulatore fisiologico di particolare interesse è l'ipossia. Alcuni studi suggeriscono che condizioni ipossiche influenzino sia la nicchia che direttamente le CSE inducendo in quest'ultime uno stato quiescente. Ruolo cruciale nell'induzione della quiescenza lo ricopre il fattore di trascrizione ipossia indotto-1 (HIF1) [11]. Come già detto, numerosi studi dimostrano che le cellule staminali più indifferenziate, con capacità di ricostituire il sistema emopoietico in vivo, risiedono nella regione endostale del midollo tipicamente caratterizzata da ipossia e scarsa vascolarizzazione. La dimostrazione che le CSE risiedano in zone ipossiche è basata proprio sul fatto che le CSE esprimano HIF-1 e siano quiescenti.

In realtà, studi recenti dimostrano che la regione endostale è più vascolarizzata di quanto ipotizzato e che la maggior parte dei progenitori indifferenziati risiede proprio vicino ai vasi [12], quindi in una zona relativamente ben ossigenata. Una probabile spiegazione a questa discrepanza tra elevata vascolarizzazione ed espressione di HIF-1, può essere data ipotizzando un profilo costitutivamente ipossico delle CSE, a prescindere dalla loro

localizzazione nel midollo. A supporto di questa ipotesi, c'è l'osservazione che anche le CSE presenti nel circolo sanguigno mostrano un profilo ipossico.

II. LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

1. La Leucemia Mieloide Acuta (LAM)

La leucemia mieloide acuta (LAM) è una neoplasia ematologica a carico del compartimento staminale emopoietico, caratterizzata da un'abnorme produzione di cellule immature delle linee mieloidi. La trasformazione neoplastica altera i meccanismi che regolano la proliferazione e il differenziamento cellulare impedendo la maturazione e la formazione delle cellule mature del lineage mieloide. La mancata maturazione è causa di un accumulo di "blasti" indifferenziati nel midollo osseo e nel sangue periferico; queste cellule sono in grado di proliferare autonomamente e sono totalmente o parzialmente incapaci di dare origine a cellule mature pur mantenendo alcune caratteristiche morfologiche, citochimiche e immunofenotipiche proprie della controparte di normali precursori morfologicamente riconoscibili.

Le LAM sono prevalentemente neoplasie dell'età adulta (mediana 60-65 anni) anche se possono comparire ad ogni età. Dal punto di vista dell'insorgenza, la LAM può insorgere come neoplasia "primaria" o "de novo" in soggetti che non sono stati esposti ad agenti leucemogeni, oppure può svilupparsi come

neoplasia “secondaria” a esposizione ad agenti leucemogeni o ad una precedente sindrome mielodisplastica di cui rappresenta l’evoluzione.

La sintomatologia di questa malattia è piuttosto variabile ed è legata all’insufficiente produzione di cellule mature, quindi anemia per mancanza di globuli rossi, infezioni per mancanza di neutrofili, emorragie per mancanza di piastrine; ma anche all’infiltrazione di tessuti e organi da non emopoietici da parte delle cellule leucemiche (splenomegalia, epatomegalia e linfadenopatia). Altro fattore condizionante il quadro clinico è la produzione di citochine da parte delle cellule del sistema immunitario e dei blasti stessi, che inducono sintomi generali come febbre, dolori muscolari, sudorazione profusa e calo ponderale. Le LAM sono un gruppo di neoplasie piuttosto eterogenee e la classificazione è fondamentale per la cura, cioè senza prima aver conosciuto di quale forma esattamente il paziente è affetto, non è possibile fare trattamento alcuno. La classificazione può essere morfologica e citochimica. La LMA si classifica sulla base della morfologia e della citochimica secondo lo schema Francese Britannico Americano o FAB. Questa classificazione identifica differenti sottotipi di LAM in base alla linea differenziativa della popolazione leucemica e alla completa e parziale soppressione della capacità maturativa del clone neoplastico (tabella 1). La classificazione dell’Organizzazione Mondiale della Sanità prende in considerazione, oltre agli aspetti morfologici, quelli molecolari e citogenetici, che possono assumere un importante significato prognostico. Le alterazioni citogenetiche possono essere singole o presenti in

associazione e la loro frequenza alla diagnosi varia tra il 60% e il 90%. Le alterazioni cariotipiche complesse si associano ad una prognosi peggiore. Pazienti con traslocazione dei cromosomi 8 e 21 (t(8;21)), inversione del cromosoma 16 (inv(16)) e traslocazione dei cromosomi 15 e 17 (t(15;17)) hanno prognosi estremamente favorevole, mentre altre alterazioni cromosomiche quali la delezione del braccio lungo del cromosoma 5 (del(5q) ed anomalie del braccio corto del cromosoma 12 (12p), sono associate ad una prognosi più sfavorevole. Le probabilità di guarigione o di lunga sopravvivenza sono vicine al 25% ma la prognosi e il decorso sono fortemente influenzati dall'età del paziente principalmente per la ridotta capacità del paziente di sopravvivere alla terapia di induzione necessaria per ottenere una remissione completa.

FAB	LINEA DIFFERENZIATIVA	FREQUENZA (%)	MORFOLOGIA	CITOCHIMICA	IMMUNOFENOTIPO DI MEMBRANA
M1	MIELOBLASTICA Senza maturazione	18	Blasti >90%	Perossidasi o Sudan B (>3% blasti positivi)	CD13, CD33, MPO7, CD14
M2	MIELOBLASTICA Con maturazione	35	Blasti <90%	Perossidasi o Sudan B (>20% blasti positivi)	CD13, CD33, MPO7
M3	PROMIELOCITICA	10	Blasti ipergranulati tipo PMC		CD13, CD33, MPO7
M4	MIELOMONOBLASTICA	20	Blasti e altre cellule granulocitarie più mature >30%	Perossidasi o Sudan B Nasde NaF parzialmente resistenti, Anae	CD13, CD33, CD14
M5	MONOBLASTICA	13	Monoblasti <80%	Nasde NaF sensibili, Anae	CD14, CD13, CD33
M6	ERITROBLASTICA	3	Eritroblasti >50% e blasti >30% delle cellule non eritroidi	Pas (eritroblasti) Perossidasi o Sudan B	CD42
M7	MEGACARIOBLASTICA	1	Blasti >30%, marcata mielofibrosi	Perossidasi piastrinica	CD41

Tabella 1. Classificazione FAB nelle LAM

Il regime terapeutico della LAM prevede due fasi di trattamento: la fase di *induzione* e la fase di *consolidamento*. La terapia di induzione si basa principalmente sulla somministrazione di agenti citotossici al fine di ridurre ai minimi termini la massa leucemica, in modo da permettere alle cellule staminali normali residue di ricreare un'emopoiesi normale. I farmaci prevalentemente usati sono la Citosina Arabinoside e le Antracicline. Per avvicinare il più possibile la remissione di malattia alla guarigione, il regime polichemioterapico viene ripetuto per altri 1-2 cicli di consolidamento al termine dei quali le alternative sono: la sospensione della terapia, la continuazione di altri cicli di consolidamento oppure il trapianto di midollo. Un caso a parte è rappresentato dalla LAM promielocitica M3, la cui alterazione citogenetica tipica, la traslocazione dei cromosomi 15 e 17 (t(15;17)), dà origine al trascritto di fusione PML-RAR α codificante per una forma chimerica del recettore per l'acido trans-retinoico (ATRA). Questa forma del recettore mostra una scarsa affinità per il proprio ligando, indispensabile per indurre il differenziamento dei promielociti. La terapia specifica prevede la somministrazione quotidiana di ATRA ad alte dosi, che induce il differenziamento dei promielociti leucemici rendendo non necessario l'utilizzo di farmaci citotossici.

Nonostante i numerosi progressi compiuti negli ultimi anni, la sopravvivenza dei pazienti affetti da questa neoplasia resta piuttosto bassa, intorno al 25%. La principale causa di questo insuccesso terapeutico è l'incapacità delle terapie convenzionali di eradicare il compartimento staminale leucemico che resta così

in grado di ripopolare il clone leucemico; altro aspetto importante è l'elevata tossicità dei farmaci utilizzati. Una migliore comprensione dei processi di trasformazione neoplastica e una miglior caratterizzazione del compartimento staminale leucemico saranno necessari per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche più efficaci e meno tossiche per il paziente. [1]

2. La cellula staminale leucemica

Lo sviluppo negli anni '80 di metodiche quantitative per la valutazione del potenziale clonogenico delle cellule neoplastiche emopoietiche ha portato per la prima volta alla dimostrazione dell'esistenza di un piccolo subset di cellule tumorali in grado di proliferare estensivamente *in vitro* [13]. Da allora numerosi studi hanno contribuito a rafforzare l'idea di una stretta relazione tra cellule staminali e tumore; supponendo che le cellule tumorali contengano al loro interno una popolazione di cellule staminali tumorali dotate di self-renewal e in grado di supportare la crescita tumorale. Introducendo il concetto di cellula staminale tumorale, questi studi hanno dimostrato l'esistenza di una certa eterogeneità funzionale all'interno della popolazione di cellule tumorali. Successivamente gli studi sulla LAM hanno chiarito le basi biologiche di questa eterogeneità. Come precedentemente descritto, la LAM è una neoplasia clonale caratterizzata dall'accumulo di blasti immaturi incapaci di differenziare. Nonostante a livello morfologico la popolazione leucemica sia piuttosto

omogenea, a livello funzionale si osservano molte differenze. Soltanto una piccola parte di blasti proliferanti è in grado di dare colonie (AML-CFU) *in vitro*. Queste osservazioni suggeriscono che, come accade nell'emopoiesi normale, il clone leucemico nelle LAM ha un'organizzazione gerarchica, nella quale una piccola percentuale di progenitori proliferanti provvedono continuamente ad incrementare la popolazione "bulk" di blasti leucemici.

Verso la fine degli anni '90, l'esistenza di cellule staminali tumorali è stata per la prima volta dimostrata nella LAM [14] [15] [16] e successivamente estesa anche ad altri tipi di tumore [17] [18] [19]. E' stato dimostrato che la maggior parte delle cellule leucemiche non sono in grado di proliferare estensivamente e solo una ristretta sottopopolazione cellulare con fenotipo definito (CD34⁺CD38⁻) possiede proprietà clonogeniche capaci di trasferire la AML in topi immunodeficienti (NOD/SCID) [14]. Al contrario, ad eccezione della leucemia promielocitica acuta M3 (APL), i progenitori più maturi con fenotipo CD34⁺CD38⁺ non riescono a indurre la leucemia nei topi NOD/SCID. Questi dati suggeriscono che nella maggior parte delle LAM sono le CSE il bersaglio delle trasformazione leucemica piuttosto che i progenitori già commissionati. Nella APL, il processo di trasformazione può invece coinvolgere una cellula emopoietica più matura come dimostrato dall'espressione della traslocazione t(15; 17) e del gene di fusione PML/RARα nella sottopopolazione CD34⁺CD38⁺ ma non in quella CD34⁺CD38⁻ [20]. Nonostante esistano convincenti evidenze sull'origine delle LAM dalle CSE, approfonditi studi sulle caratteristiche

fenotipiche delle cellule staminali leucemiche (LSCs) hanno evidenziato notevoli differenze tra le stesse LSCs e le CSE. Infatti, mentre molti marcatori di superficie sono condivisi da entrambe le popolazioni cellulari come il CD34, CD38, HLA-DR e CD71, altri sono espressi in maniera differente [21]. In particolare le LSCs non esprimono il CD90 o Thy-1 [22] mentre le cellule leucemiche, ma non la controparte normale, esprimono il recettore dell'IL-3 (CD123) [23]. Nonostante le poche differenze fenotipiche tra cellule staminali normali e leucemiche, ulteriori caratterizzazioni hanno dimostrato che le LSCs non sono omogenee, ma anzi sono eterogenee per quanto riguarda i tempi di attecchimento, tempo di comparsa e di scomparsa dei diversi cloni attecchiti, capacità proliferativa e stato di quiescenza [24]. Queste caratteristiche sono state riportate anche per le CSE normali [25]. Il trapianto di cellule umane di AML ha portato alla dimostrazione che solo rare cellule, denominate Cellule Inizianti Leucemia nei topi SCID (SL-IC o LSC), sono in grado di iniziare e sostenere la crescita del clone leucemico in vivo. Oltre alla loro capacità di differenziare e di proliferare, trapianti seriali hanno dimostrato che le SL-IC possiedono un alto grado di self-renewal e possono pertanto essere considerate le vere cellule staminali della LAM [14] [26]. Analogamente al sistema emopoietico normale, anche il tessuto leucemico di LAM è organizzato in una gerarchia di classi cellulari distinte, funzionalmente eterogenee, tutte derivanti da un piccolo "pool" di LSCs.

L'origine della cellula staminale leucemica è stato il focus di numerosi studi negli ultimi decenni, ma il target cellulare nel quale avviene l'evento trasformante in senso neoplastico rimane ancora non chiarito. Poiché le cellule staminali normali e quelle leucemiche condividono le stesse caratteristiche di self-renewal e condividono numerosi pathway di sviluppo, è stato ipotizzato che la cellula staminale leucemica derivi da una cellula staminale normale che ha accumulato mutazioni scatenanti la trasformazione neoplastica. Allo stesso modo, però, la cellula staminale leucemica potrebbe derivare da un progenitore più commissionato o da una cellula matura differenziata, che abbiano ri-acquisito la capacità di self-renewal e in seguito accumulato mutazioni (fig.2).

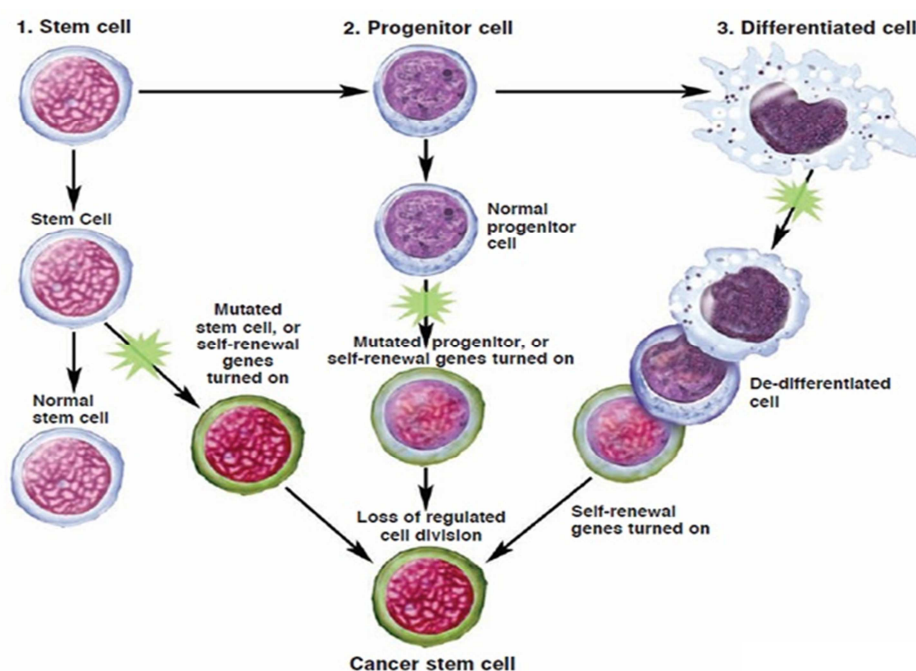


Figura 2. Origine della cellula staminale leucemica. Goldthwaite CA. "Regenerative Medicine", Chapter 9, 2008

Ci sono due evidenze a supporto della prima ipotesi. La prima è che le CSE hanno i meccanismi necessari per il self-renewal già attivati e il mantenimento di questi meccanismi è più semplice dell'attivazione "de novo" nelle cellule più differenziate. Inoltre, le cellule staminali permangono più a lungo nei tessuti e per questo è più probabile che accumulino più mutazioni rispetto a cellule differenziate con un'emivita più breve. Il fatto che nella maggior parte delle LAM solo una ristretta sottopopolazione cellulare con fenotipo definito (CD34⁺CD38⁻) sia in grado di trasferire la leucemia umana in topi immunocompromessi [14], come avviene per le CSE, mentre i progenitori più maturi con fenotipo CD34⁺CD38⁺ non sono in grado di farlo, supporta l'origine staminale dell'evento trasformante.

Viceversa, la dimostrazione che cellule prive di capacità di self-renewal, come i progenitori commissionati o le cellule mature, possono essere il target della trasformazione leucemica arrivano da studi sui geni associati alla leucemia nel topo. Cozzio e colleghi hanno dimostrato che il gene di fusione leucemico MLL-ENL, risultato dalla traslocazione t(11;19), è in grado di sviluppare una leucemia se trasdotto sia in CSE che in progenitori più differenziati (CMP o GMP) [27]. Un altro gene di fusione che contribuisce alla trasformazione in entrambe le popolazioni è il gene MOZ-TIF2. Ma, anche se il modello murino costituisce un buon *tool* su cui studiare i processi di leucemogenesi, i dati ottenuti nel topo non è detto che rispecchino gli stessi eventi trasformanti nell'uomo. Ad ogni modo, appare altamente probabile che nella leucemia

umana l'evento trasformante possa avvenire sia a livello del compartimento staminale che dei progenitori più differenziati a seconda del gene di fusione considerato.

3. La nicchia leucemica

E' ormai stato ampiamente dimostrato che le LSC occupano e interagiscono con il microambiente midollare, dal quale ricevono supporto per il self-renewal e dal quale possono sfruttare i normali meccanismi omeostatici che preservano le CSE. In numerosi studi, mediante l'utilizzo di modelli murini di xenotrapainto, è stato approfondito il ruolo del microambiente nella regolazione del ciclo cellulare, dell'engraftment delle cellule staminali leucemiche così come nello sviluppo di farmacoresistenza [28]. E' stato dimostrato che cellule primarie di LAM CD38-CD34+ inoculate in topi NOD/SCID/IL2 γ^{null} migrano nella nicchia endostale e risultano essere arricchite in una popolazione quiescente e resistente agli effetti citotossici dell'arabinoside. Risultati simili sono stati ottenuti in vitro con colture di cellule di leucemia acuta linfoblastica dove la resistenza all'asparaginasi era conferita da cellule mesenchimali secernenti asparagina sintetasi [29]. Un altro esempio di come il microambiente influenzi lo sviluppo leucemico viene da uno studio [30] che per la prima volta dimostra come una leucemia indotta mediante trasduzione dell'oncogene MLL-AF9 (derivato dalla traslocazione t(9,11) in pazienti con LAM) richiede il

coinvolgimento del microambiente per il differenziamento immunofenotipico. Cellule CD34⁺ trasdotte con l'oncogene MLL-AF9 inducono una leucemia linfoblastica se trapiantate in topi NOD/SCID β ^{2null}, inducono invece una LAM se trapiantate in topi NOD/SCID transgenici per i geni delle citochine SCF, GM-CSF e IL3.

Altro aspetto molto importante è la definizione dei meccanismi e delle interazioni stromali che regolano il "trafficking" delle LSCs verso i tessuti emopoietici, l'ingresso in circolo e la colonizzazione in altri organi [31].

E' già stato dimostrato chiaramente il ruolo essenziale dell'interazione SDF-1/CXCR4 sia nell' homing che nell' attecchimento nel midollo osseo murino da parte CSE. SDF-1 è il più potente chemo-attraente per i progenitori indifferenziati CD34⁺ [32] [33] e regola molte interazioni tra cellule umane primitive CD34⁺ ed il microambiente midollare. L'interazione tra CXCR4 e CXCL-12 sembra essere utilizzata anche dalle LSC.

Nelle Leucemie Acute Linfoblastiche (ALL) la migrazione e l'homine delle cellule leucemiche è dipendente dall'interazione fra SDF-1/CXCR4 come per le cellule emopoietiche normali, ma esistono grosse differenze nell'espressione di CXCR4 e nella capacità migratoria verso gradienti diversi di SDF-1 [34]. Inoltre le cellule staminali leucemiche sono in grado di modulare direttamente il microambiente *down-regolando* i livelli di CXCL-12 nell'area di infiltrazione leucemica

E' stato dimostrato che le cellule di LAM esprimono alti livelli di CXCR4 sono indice di prognosi sfavorevole. L'importanza dell'asse CXCR4/CXCL-12 è stata recentemente dimostrata da Colomone e colleghi [35]. Cellule di LAM trapiantate nel topo migrano verso la nicchia midollare SDF-1 positiva; un mese dopo il trapianto i livelli di SDF-1 diminuiscono ma, inoculando cellule CD34⁺ normali queste sono in grado di raggiungere e colonizzare la nicchia stessa con un meccanismo CXCL-12 indipendente ma correlato ai livelli di Stem Cell Factor (SCF) secreti dai blasti stessi. Nel complesso questi dati dimostrano che le LSC possono aggirare i convenzionali meccanismi utilizzati dalle CSE e influenzare la composizione della nicchia a proprio vantaggio.

Le cellule staminali leucemiche presenti nella nicchia ipossica presentano elevati livelli del fattore trascrizionale HIF-1, il quale mediante attivazione di *loop* paracrini induce l'over-espressione di SDF-1 da parte delle cellule endoteliali e contemporaneamente incrementa l'espressione del CXCR4 sulle cellule di LAM stessa mediante attivazione autocrina.

Un altro aspetto fondamentale nell'interazione LSC-nicchia è rappresentato dalla capacità di adesione. Le LSC esprimono un'aumentata capacità di adesione allo stroma midollare rispetto alle CSE, mediata dall'espressione di integrine come VLA-4 che permettono l'ancoraggio della LSC nella nicchia e la sua persistenza.

Considerati nel complesso questi risultati, evidenziano il ruolo fondamentale del microambiente nel regolare l'homing, la proliferazione e il mantenimento

delle cellule leucemiche e suggeriscono che la modulazione del microambiente potrebbe essere alla base dello sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

III. NUCLEOTIDI EXTRACELLULARI E RECETTORI P2

1. I nucleotidi ATP e UTP

I nucleotidi extracellulari ATP e UTP sono , dal punto di vista evolutivo, le molecole più antiche e conservate tra le specie. Il loro ruolo cruciale nella sintesi degli acidi nucleici e nel metabolismo energetico cellulare è noto da molti anni; ma il loro coinvolgimento nella regolazione di numerose funzioni cellulari è piuttosto recente. I primi a dimostrarlo furono Drury e Szent-Gyorgy negli anni '20 del secolo scorso, i loro studi dimostrarono l'azione bradicardica e vasodilatatrice di queste nuove molecole. Le loro osservazioni rimasero isolate fino a quando nel 1978 il biochimico Geoff Burnstock identificò l'ATP come neurotrasmettitore nelle sinapsi neuronali del sistema nervoso autonomo. I suoi studi portarono anche all'identificazione di recettori di membrana specifici per i nucleotidi extracellulari, i recettori purinergici [36] [37].

Gli studi pionieristici di Burnstock diedero il via a numerosi studi sul ruolo cardine dei nucleotidi nella regolazione delle funzioni cellulari; arrivando così alla dimostrazione del loro coinvolgimento come regolatori della proliferazione, del differenziamento, della chemotassi, del rilascio di citochine, della formazione di specie reattive dell'ossigeno, così come dell'induzione di morte

cellulare per apoptosi o necrosi. Di recente acquisizione è anche l'osservazione del loro ruolo nei processi che regolano l'infiammazione.

I nucleotidi trifosfato, ATP e UTP, si localizzano nel citoplasma cellulare svolgendo le due funzioni chiave per la sopravvivenza della cellula stessa: la sintesi di acidi nucleici e il metabolismo energetico. La concentrazione citoplasmatica di ATP è molto elevata (5-10mM) e potenzialmente, se opportunamente stimolate, tutte le cellule possono rappresentare una fonte di nucleotidi. Ogni cellula può riversare nel microambiente extracellulare variabili quantità di nucleotidi, attraverso meccanismi di tipo litico o attraverso rilascio regolato. Per cui, ogni evento che porti a lisi cellulare (danno, necrosi, lisi, apoptosi etc.) o a danni strutturali della membrana plasmatica, contribuisce all'incremento della concentrazione extracellulare di nucleotidi. In risposta a vari stimoli di tipo meccanico, chimico, infiammazione, numerosi tipi cellulari sono in grado di rilasciare nucleotidi mediante esocitosi di granuli secretori o attraverso canali di membrana (pannessine). Ad esempio è stato dimostrato che, in risposta all'aumento del flusso sanguigno, le cellule endoteliali rilasciano ATP e a livelli della nicchia osteoblastica, in seguito ad una pressione meccanica, gli osteoblasti rilasciano ATP attivando in maniera autocrina il proprio differenziamento e inducendo il blocco dell'attività osteoclastica, per via paracrina.

Una volta rilasciati nell'ambiente extracellulare i nucleotidi vengono rapidamente degradati da enzimi presenti ubiquitariamente sulle membrane

cellulari, le *ectonucleotidasi*. Fanno parte di questa famiglia i due principali enzimi coinvolti nella degradazione dell'ATP: la E-NTPDasi o CD39, ad attività ectopirastica, che media l'idrolisi di nucleotidi 5'-trifosfati, e di nucleosidi 5'-tri e difosfati; e la E-PDNP (ecto-phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase) o CD73, che catalizza la conversione di ATP in AMP e pirofosfato inorganico (Pi), di cAMP in AMP e adenosina. In condizioni basali, il bilanciamento tra l'azione delle ectonucleotidasi e i meccanismi di rilascio, permette il mantenimento di concentrazioni costanti di nucleotidi nel microambiente extracellulare nell'ordine dei nM. Anche se le concentrazioni extracellulari in condizioni basali sono molto basse, queste sono sufficienti ad attivare in maniera tonica i meccanismi regolati dai nucleotidi stessi.

2. I recettori purinergici

La parte dei nucleotidi rilasciati che non vengono degradati dalle ectonucleotidasi esplicano la loro funzione legandosi a specifici recettori di membrana, i *recettori purinergici*.

I recettori purinergici sono stati per la prima volta identificati da Burnstock nel 1978 e da allora vengono distinti in due classi: i purinocettori P1, il cui principale ligando naturale è l'adenosina e i purinocettori P2, ai quali si legano ATP, ADP, UTP e UDP [38]. Questa distinzione si basa, oltre che sulla specificità per i vari ligandi, sulla

diversa struttura molecolare e sulle diverse vie di segnale che vengono attivate dai recettori stessi.

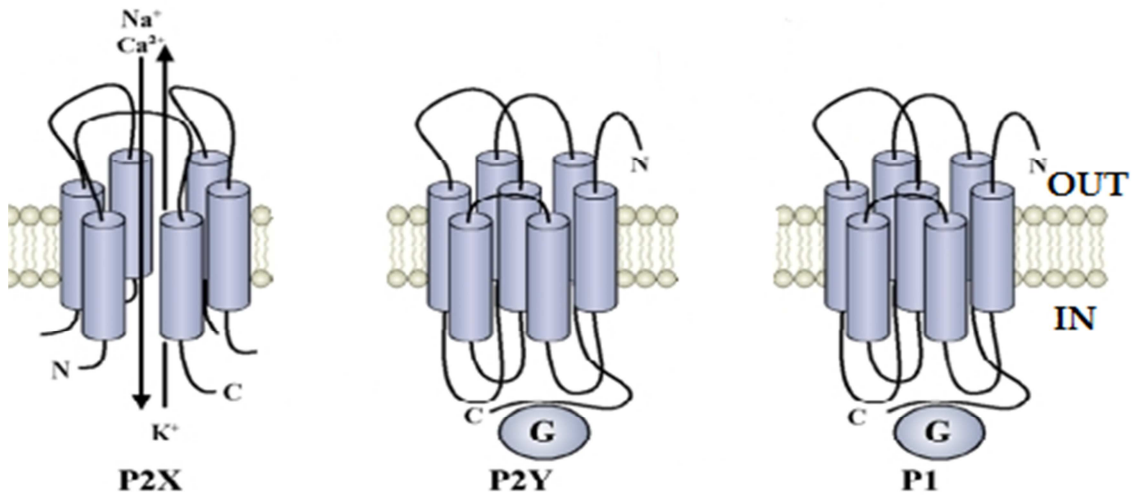


Figura 3. I recettori purinergici

La famiglia dei **recettori P1** comprende i recettori A_1 , A_{2A} , A_{2B} , and A_3 . Identificati mediante studi di tipo molecolare, biochimico e farmacologico, questi recettori sono stati clonati in numerose specie e sono stati studiati, in particolare, nel sistema nervoso, nelle cellule immunitarie e nelle piastrine. Tutti i recettori P1 sono formati da sette domini transmembrana (TM) accoppiati a proteine G (figura 3). Questi recettori non verranno presi in considerazione in questo studio.

Oggetto di questo studio, sono invece i **recettori P2**. Questa famiglia recettoriale è suddivisa, in base a caratteristiche molecolari, in due sottogruppi: i recettori **P2X** e i recettori **P2Y** (figura 3).

Recettori P2Y. Questi recettori sono proteine a sette eliche trans-membrana, composte da 328-379 aminoacidi, i cui domini carbossi- e amino- terminali si trovano a

livello intracellulare ed extracellulare, rispettivamente. Sono recettori accoppiati a proteine G e le via di segnale attivate dalla loro stimolazione coinvolgono l'attivazione della fosfolipasi C e l'inibizione/attivazione dell'adenilato ciclasi. Ad oggi sono stati clonati 8 sottotipi recettoriali P2Y: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄.

Tutti i recettori P2Y sono attivati dall'ATP, ma ai recettori P2Y₆ e P2Y₄ l'UTP si lega con maggior affinità, mentre per il P2Y₂R i due ligandi sono equipotenti. L'UTP è inattivo sul recettore P2Y₁, sul quale si lega invece l'ADP e in maniera meno affine l'ATP. L'UTP è inattivo anche sul recettore P2Y₁₁, al quale si legano invece ATP e ADP. Lo studio dei recettori P2Y è stato, negli anni, limitato dalla mancanza di specifici anticorpi per i vari sottotipi recettoriali e dalla scarsa disponibilità di antagonisti specifici [39] [40].

Recettori P2X. Questi recettori sono canali ionici che mediano cambiamenti veloci e transienti della permeabilità della membrana agli ioni mono e divalenti (Na⁺, K⁺ e Ca²⁺). Inizialmente sono stati clonati nelle cellule eccitabili e successivamente è stato dimostrato essere canali ubiquitari.

Strutturalmente sono formati da subunità contenenti due domini idrofobici transmembrana, le cui estremità amino- e carbossi- terminale si trovano nel citoplasma cellulare (Figura). Tali subunità si assemblano a formare omo- ed eterodimeri che costituiscono la struttura recettoriale vera e propria. Ad oggi sono stati clonati sette sottotipi recettoriali P2X: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₆, P2X₇.

In seguito all'attivazione dei recettori P2X mediante legame con ATP, un rapido influsso di ioni Na⁺ e Ca²⁺ associato all'efflusso di ioni K⁺ induce la depolarizzazione

della membrana plasmatica che porta all'incremento della concentrazione citosolica di ioni Ca^{2+} . Il brusco cambiamento dell'omeostasi ionica all'interno della cellula attiva una serie di messaggeri intracellulari e pathway di segnale che non sono ancora del tutto chiariti. Anche se la disponibilità è limitata, esistono in commercio alcuni anticorpi utilizzabili per lo studio di questa famiglia di recettori (in particolare, Abs contro P2X₁, P2X₄, P2X₇). Oltre al proprio ligando naturale, sono disponibili alcuni agonisti o antagonisti specifici che permettono lo studio di alcuni recettori, vorrei citare tra questi il PPADS, inibitore non competitivo dei P2X e l'OxidizedATP e il KN-62, inibitori specifici del P2X₇R [40] [39].

3. Signaling purinergico e sistema emopoietico

Il signaling purinergico nell'emopoiesi è stato ampiamente studiato, soprattutto a livello delle cellule terminalmente differenziate; ed è stato osservato essere implicato nella regolazione di molte funzioni cellulari incluse l'aggregazione piastrinica [41], la chemotassi [42] [43], il differenziamento, la morte cellulare e l'attività pro-infiammatoria [44].

Ad esempio, i progenitori mieloidi rispondono alla stimolazione con ATP e UTP modulando le proprie funzionalità. E' stato dimostrato che il recettore P2Y₂ viene espresso per tutto il percorso maturativo da progenitore a neutrofilo maturo, nel quale partecipa poi ai processi di migrazione e degranulazione. Altro esempio è rappresentato dal recettore P2Y₁₁ la cui stimolazione nei monociti favorisce il differenziamento in cellule dendritiche e incrementa la secrezione di citochine come l'interleuchina-1 β .

L'azione citotossica dei nucleotidi sembra invece essere legata prevalentemente ai recettori P2X4 e P2X7 [40]. Una stimolazione prolungata nel tempo di questi recettori porta a morte cellulare per lisi osmotica, mentre una stimolazione intermittente induce apoptosi. Un altro fenomeno importante in cui sono coinvolti i nucleotidi è la regolazione del sistema immunitario. In particolare, i nucleotidi rilasciati dalle cellule morenti vanno ad agire come “*danger signals*” che stimolano in maniera autocrina e paracrina la risposta immunitaria. E' stato dimostrato che l'ATP è in grado di inibire la proliferazione dei linfociti T_{regolatori} e di attivare invece la proliferazione dei T_{naive}, evidenziando così il proprio ruolo di regolatore nel bilanciamento tra attivazione e spegnimento della risposta immunitaria. [45]

Negli ultimi dieci anni, il nostro gruppo di ricerca ha a lungo studiato il ruolo che i nucleotidi ricoprono nella regolazione del compartimento staminale emopoietico. Abbiamo osservato che i nucleotidi sono dei forti stimolatori delle CSE, promuovendone la proliferazione e la migrazione cellulare in vitro, così come l'homing e l'engraftment in vivo [46] [47]. Poiché la quiescenza è una caratteristica fondamentale per il mantenimento a lungo termine del compartimento staminale, una continua stimolazione delle CSE con alte concentrazioni di “*danger signal*”, come i nucleotidi, possono portare all'esaurimento del compartimento staminale. Questa osservazione potrebbe spiegare gli effetti dannosi che un'inflammatione cronica può avere sull'emopoiesi.

4. Signaling purinergico e cancro

Il potenziale terapeutico della modulazione del signaling purinergico è argomento di interesse da molti anni. L'effetto antineoplastico dell'ATP è stato dimostrato per la prima volta da Rappaport nel 1983, dimostrando che l'aggiunta di ATP endogeno alla coltura di cellule di adenocarcinoma pancreatico e del colon induceva un blocco della crescita e un blocco del ciclo cellulare in fase S [48]. Al contrario è stato osservato che l'adenosina ha un effetto favorente la crescita tumorale [49]. Numerosi studi successivi a quello di Rappaport hanno confermato gli effetti antitumorali dell'ATP in numerosi modelli tumorali: tumori epiteliali, cancro alla cervice, cancro dell'esofago, cancro a cellule squamose, epatoma, cancro alla prostata, glioma e melanoma, neuroblastoma, cancro al polmone, retinoblastoma e cancro alla vescica. [50] Così come è ormai confermato l'effetto citotossico dell'ATP su molti tumori, è altrettanto chiaro che basse dosi di ATP hanno invece un effetto opposto, di promozione della crescita. A seconda dei sottotipi recettoriali P2 espressi, le cellule tumorali possono essere più sensibili all'effetto citotossico o a quello trofico dell'ATP. Questa osservazione mette in luce l'importanza di un'approfondita caratterizzazione dei recettori purinergici nelle cellule tumorali per poter capire il potenziale di queste vie di signaling nello sviluppo di strategie terapeutiche.

L'inibizione della crescita tumorale in seguito a stimolazione con ATP coinvolge vari sottotipi recettoriali P2. L'effetto antineoplastico osservato è il risultato di più effetti combinati, ossia l'inibizione della proliferazione, l'induzione al differenziamento e la morte cellulare che avvengono mediante la stimolazione di più recettori. Ad oggi, i recettori che sembrano maggiormente implicati nell'inibizione della crescita tumorale

sono i recettori P2Y₁, P2Y₂, P2Y₁₁, P2X₅, P2X₇ [51]. Il recettore P2Y₁ inibisce la proliferazione nelle cellule di melanoma e nel tumore della pelle a cellule squamose. Nel tumore dell'intestino e dell'esofago il recettore P2Y₂ induce apoptosi, mentre nel melanoma stimola la proliferazione [50]. Nella linea leucemica HL60 i recettori P2X₇ mediano segnali di inibizione della proliferazione. Nel melanoma, nel tumore della pelle a cellule squamose e nel tumore del polmone induce apoptosi. E' comunemente accettato che il recettore P2X₇ media segnali di morte cellulare per apoptosi o necrosi; ma gli analisi dei suoi effetti sulle cellule tumorali si complica in seguito all'osservazione che toniche stimolazioni di questo recettore possono attivare segnali trofici nella cellula neoplastica.

E' sempre più evidente che l'insorgenza e la progressione tumorale non dipendono soltanto da caratteristiche intrinseche alla cellula neoplastica. Sia la composizione biochimica del microambiente tumorale che l'interazione tra cellule tumorali e cellule dell'ospite ricoprono un ruolo cardine nell'evoluzione della malattia.

Studi in vivo hanno dimostrato che il milieu extracellulare dei tumori solidi è ricco di adenosina. Data la ben nota capacità immunosoppressoria dell'adenosina, questa scoperta ci da uno spunto cruciale per capire i meccanismi di "tumor escape" messi in atto dal tumore. Recentemente è stato dimostrato che il microambiente tumorale, ma non quello normale, presenta un'alta concentrazione di ATP. Sembra quindi che il microambiente tumorale sia un sito ad altro rilascio/generazione di ATP extracellulare e conversione ad adenosina, che insieme concorrono a creare un milieu ricco di fattori trofici e immunomodulatori [50].

E' stato dimostrato che alcuni tipi tumorali rilasciano abbondanti quantità di ATP in seguito a vari stimoli, come l'ipossia, le deformazioni meccaniche o l'ischemia e che esiste una forte correlazione tra livelli di ATP nelle cellule tumorali e sviluppo della malattia. Anche la chemioterapia può indurre rilascio di ATP da parte delle cellule tumorali. Alcuni studi hanno dimostrato che alcuni farmaci, come le antracicline, sono in grado di indurre morte immunogenica nelle cellule tumorali, innescando una risposta immunitaria antitumorale. E' stato ipotizzato che l'ATP rilasciato dalle cellule tumorali morenti in seguito a chemioterapia possa attivare l'inflammasoma. Farmaci come la doxorubicina, possono indurre rilascio di ATP prima e durante i processi di apoptosi della cellula tumorale ma anche dalle cellule dendritiche (DC) [52] [53] [54]. In questo processo, l'incremento di ATP nel microambiente tumorale diventa cruciale, poiché l'ATP stimola il recettore P2X₇ sulle cellule dendritiche inducendole a secernere la citochina pro-infiammatoria IL-1 β . Questa citochina potenzia la presentazione dell'antigene ai linfociti CD4⁺ promuovendo la risposta immunitaria.

Come detto in precedenza, i livelli di ATP sono importanti per la determinazione dell'outcome della malattia, dal momento che alte dosi di ATP potenziano la risposta immunitaria, mentre basse dosi risultano essere immunosoppressive. L'immunosoppressione è dimostrata dal fatto che DCs stimulate con basse concentrazioni di ATP producono meno citochine pro-infiammatorie, più IL-10 e in sinergia con gli interferoni aumentano i livelli di espressione dell'enzima immunomodulatorio indoleamina 2,3-diossigenasi [55].

L'effetto antitumorale dell'ATP è stato testato nell'uomo in alcuni trials clinici di fase I e II per il trattamento del tumore polmonare. Gli effetti osservati nei pazienti

arruolati nei trial hanno confermato le osservazioni fatte nel modello murino. L'ATP ha una buona tollerabilità in vivo e una buona attività terapeutica, soprattutto correlata alla diminuzione della perdita di peso e alla diminuzione dell'insorgenza di stati cachettici.

[56] [57] [58]

Materiali e Metodi

1. Cellule

Tutti i campioni umani utilizzati in questo studio sono stati ottenuti previo consenso informato, secondo le linee guida istituzionali.

Le cellule leucemiche utilizzate in questo studio sono state isolate da sangue periferico di 35 pazienti affetti da Leucemia Acuta Mieloide alla diagnosi, che presentavano una percentuale di blasti circolanti superiore al 90%. Le caratteristiche dei pazienti sono riportate nella tabella 1.

I progenitori emopoietici normali sono stati ottenuti da sangue periferico di 7 donatori sani adulti sottoposti a mobilizzazione con G-CSF (rhG-CSF, lenograstim; Rhone-Poulenc Rorer). In condizioni fisiologiche basali, la concentrazione di cellule staminali emopoietiche circolanti nel sangue periferico è estremamente bassa (<0,01%). Questa percentuale, tuttavia, può essere aumentata mediante trattamenti di mobilizzazione dei progenitori dal midollo osseo al sangue periferico. Tale fenomeno può essere indotto attraverso la somministrazione per 5-6 giorni del fattore di crescita granulocitario G-CSF. Al termine di questo periodo, raggiunto il picco di mobilizzazione dei progenitori emopoietici nel sangue periferico, i donatori sono sottoposti a prelievo leucoferetico.

Al fine di recuperare le cellule mononucleate (MNC), i campioni di sangue periferico sono stati diluiti con fisiologica (rapporto 1:2) e successivamente stratificati su gradiente di densità (Ficoll-Hypaque, Amersham). Dopo

centrifugazione a 2000rpm per 20 minuti, l'anello di MNC è stato raccolto, le cellule sono state lavate con PBS e poi contate in acido acetico al 3%.

In questo studio sono state utilizzate anche linee cellulari di leucemia acuta mieloide; in particolare la linea U937, la linea OCI-AML3 e la linea HL60 (DSMZ).

# PZ	Sorgente	FAB	Anomalie Molecolari	Cariotipo	WBC,10 ³ /μL	Sesso	Età
1	BM	M4	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Inv(9)(p11q13)	2,100	M	43
2	PB	M1	NPM ⁺ FLT3 ⁻	Normale	120,000	F	68
3	PB	M1	AML-ETO(t8;21)	Normale	45,460	M	57
4	BM	M5	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Normale	3,000	F	55
5	PB	M2	FLT3 ⁻	Normale	32,510	F	65
6	BM	M0	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Normale	15,000	M	75
7	PB	M0-M1	NA	Normale	68,500	F	61
8	PB	M4	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Normale	55,450	F	52
9	PB	M5	FLT3 ⁻ NPM ⁻	t(16;11)(q27,q23)	100,900	M	22
10	PB	M1	FLT3 ITD ⁺ NPM ⁻	Normale	128,000	M	34
11	PB/BM	M1	FLT3 ITD ⁺ , TDK ⁺ , NPM ⁺	Normale	103,000	F	34
12	PB	M1	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Normale	84,460	M	61
13	PB	M5	FLT3 ITD ⁺ NPM ⁻	Normale	154,000	F	22
14	PB	M5	NPM ⁺ FLT3 ⁻	Inv(9)(p11q13)	41,900	F	49
15	PB	M4	NPM ⁺ FLT3 ⁻	Normale	38,040	F	71
16	PB	M5	FLT3 ⁺ NPM ⁻	Normale	78,000	F	43
17	PB	M7	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Normale	3,400	F	35
18	PB	M5	FLT3 ⁺ NPM ⁺	Normale	163,900	M	42
19	PB	M1	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Complesso	3,120	F	60
20	PB	M2	FLT3 ⁻	Complesso	5,250	M	61
21	PB	M4	FLT3 TDK ⁺ NPM ⁻	Normale	74,600	M	58
22	PB	M5	FLT3 ⁻ INV16, AML-ETO-	Normale	33,830	F	37
23	PB	M5	NPM ⁺ ; FLT3 TDK ⁺	46,XY +8	12,000	M	61
24	PB	M5	NPM ⁻ FLT3 TDK ⁺	Normale	88,000	M	46
25	PB	M0	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Normale	22,700	F	68

26	BM	M6	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Normale	3,750	F	34
27	PB	M1	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Normale	37,200	F	38
28	PB/BM	M2	FLT3 ⁻ NPM ⁻	XY+8(5)/46,XY 47, t(2;10)	74,360	M	42
29	PB	M0-M1	FLT3 ⁻ NPM (NA)	Normale	71,000	M	71
30	PB/BM	M1	NPM ⁺ FLT3 TDK ⁺	Normale	323,000	F	47
31	PB	M4	FLT3 ⁻ NPM ⁺	Normale	64,400	M	21
32	PB/BM	M1	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Normale	4,300	F	65
33	PB	M2	FLT3 ⁻ NPM ⁻	Normale	6,000	F	39
34	PB/BM	M1	NPM ⁺ FLT3 ITD ⁺	Normale	183,900	M	79
35	PB	M3	PML/RARalfa	t(15;17)	10,700	M	42

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti

2. Arricchimento di progenitori emopoietici normali CD34⁺ mediante separazione immunomagnetica

I progenitori emopoietici normali CD34⁺ utilizzati per questo studio sono stati ottenuti mediante un sistema di separazione immunomagnetica, secondo le istruzioni della ditta produttrice (Miltenyi Biotec). Il sistema utilizzato è basato sulla selezione positiva della popolazione di interesse, mediante marcatura diretta con biglie immunomagnetiche coniugate ad un anticorpo anti CD34. Le cellule marcate sono fatte passare in una colonna di separazione posta all'interno di un magnete: il campo magnetico permette di bloccare all'interno della matrice presente nella colonna le cellule marcate con le biglie magnetiche, lasciando eluire la frazione CD34-negativa. Il recupero delle cellule selezionate si effettua rimuovendo la colonna dal magnete ed esercitando, mediante un apposito stantuffo, una pressione sufficiente a permetterne il distacco dalla

matrice. Le cellule così recuperate vengono ulteriormente purificate mediante un secondo passaggio su un'ulteriore colonna. Così facendo si ottiene un eccellente livello di purezza, superiore generalmente al 95%.

Oltre all'elevata purezza di separazione, un altro vantaggio di questo sistema è l'utilizzo di microbiglie di soli 50 nm e dalla composizione tale (ossido di ferro e polisaccaridi), da permetterne la rapida "biodegradazione", evitando interferenze con la vitalità o le funzioni delle cellule purificate.

3. Isolamento di cellule staminali leucemiche mediante *cell sorting*

In questo studio la controparte leucemica delle cellule staminali normali è stata isolata da sangue periferico di 6 pazienti con LAM alla diagnosi utilizzando la metodica del *cell sorting*. Questa tecnologia, sfruttando le caratteristiche della citometria a flusso, permette la separazione fisica di un subset cellulare specifico presente all'interno di una popolazione eterogenea in sospensione. Ogni singola cellula viene analizzata in base a parametri fisici (Forward scatter- FSC, corrispondente alle dimensioni cellulari; Side scatter- SSC, corrispondente alla granulosità cellulare) o di fluorescenza, corrispondente alla positività per gli antigeni di interesse contro i quali è stata precedentemente eseguita una marcatura con anticorpi monoclonali. In base alle caratteristiche impostate dall'utente, il cell sorter separerà la sospensione cellulare nelle varie sottopopolazioni indicate. In questo studio abbiamo purificato cellule staminali

leucemiche in base all'espressione degli antigeni CD38 e CD34, ottenendo una sottopopolazione di staminali altamente purificate, CD38-CD34⁺. Brevemente, cellule mononucleate derivate da sangue periferico sono state marcate con anticorpi monoclonali anti hCD38 e anti hCD34, controlli isotipici sono stati effettuati per settare i valori di fluorescenza (tutti gli anticorpi utilizzati sono BectonDickinson). Al termine della separazione, le popolazioni purificate sono state rianalizzate per valutarne la purezza (99.02±0.8%). Per la separazione e l'analisi abbiamo utilizzato il cell sorter FACSAria e il software FACSDiva.

4. Quantificazione dell'espressione dell'mRNA dei P2Rs mediante Real-time qRT-PCR

L'RNA totale è stato estratto dai campioni cellulari utilizzando RNeasy Mini Kit (QIAGEN), secondo il protocollo della ditta fornitrice. La reazione di retrotrascrizione a partire da uno stampo di RNA totale è stata effettuata utilizzando un protocollo standard ed utilizzando il metodo commerciale ImpromII (Promega).

Al fine di quantificare il livello di espressione dell'mRNA del gene di ciascun recettore P2, sui campioni è stata eseguita un'amplificazione mediante real-time PCR con il sistema ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems).

La real-time è una metodo di quantificazione e amplificazione contemporanea di DNA o cDNA. Questa metodica si basa sull'utilizzo di una sonda

oligonucleotidica, specifica per una sequenza interna al nostro cDNA bersaglio, e che viene introdotta nella miscela di reazione per rivelarne l'amplificazione. Tale sonda è marcata al 5' con un fluoroforo e al 3' con un quencher e, fintanto che la sonda è integra, non viene rilevato alcun segnale di fluorescenza in quanto la vicinanza del fluoroforo al quencher assicura una soppressione della fluorescenza. Durante la reazione di PCR, se la sequenza bersaglio è presente, la sonda specifica si va a posizionare sulla regione complementare. Quando l'enzima incontra la sonda, grazie alla sua attività 5'-3' nucleasica, la scissa liberando il reporter che, allontanandosi dal quencher, emette una fluorescenza rilevabile dallo strumento che la analizza mediante specifici algoritmi. L'aumento della quantità di cDNA amplificato è direttamente proporzionale alla fluorescenza emessa dal reporter (vedi figura 1).

La valutazione dell'espressione dei geni codificanti per i recettori P2 è stata effettuata mediante un metodo di quantificazione relativo che permette di analizzare i cambiamenti nell'espressione genica di un target nei confronti di un controllo endogeno, che nel nostro caso era la GAPDH. Per la quantificazione sono stati paragonati i C_T , ossia i cicli della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello della fluorescenza basale. Abbiamo normalizzato i nostri geni target con il controllo endogeno, la GAPDH (ΔC_T), poi abbiamo comparato ciascun ΔC_T così ottenuto con il ΔC_T di un trattamento di controllo anche detto "calibratore" ($\Delta\Delta C_T$), nello

specifico un RNA universale. Il valore ottenuto da $2^{-\Delta\Delta CT}$ ha permesso di determinare la concentrazione relativa dei nostri geni target.

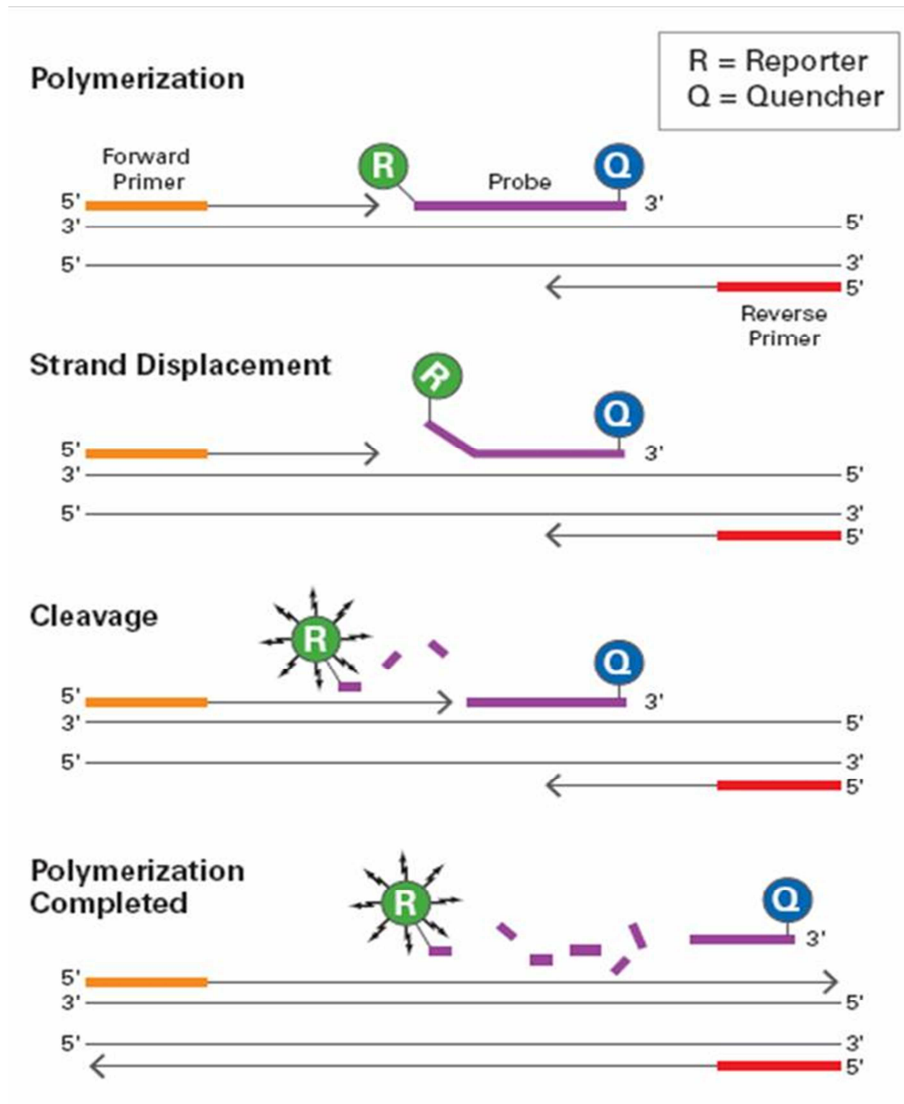


Figura 1. Sonda Taqman

Ogni reazione è stata condotta in un volume finale di 25 μ l utilizzando il seguente protocollo di reazione: cDNA (diluizione 1:3) 5 μ l, Platinum®

quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX (2X) 12,5 µl, sonda TaqMan Gene Expression (20X) specifica per ogni recettore (tabella 2) 1,25 µl.

TaqMan Gene Expression Assay Inventoried Gene GAPDH Assay ID: Hs00266705_g1
TaqMan Gene Expression Assay Inventoried Gene P2X1 Assay ID: Hs 00175686_m1
TaqMan Gene Expression Assay-Inventoried Gene P2X2 Assay ID: Hs00247255_m1
TaqMan Gene Expression Assay Inventoried Gene P2X3 Assay ID: Hs 00175689_m1
TaqMan Gene Expression Assay-Inventoried Gene P2X4 Assay ID: Hs00602442_m1
TaqMan Gene Expression Assay Inventoried Gene P2X5 Assay ID: Hs 00531938_m1
TaqMan Gene Expression Assay-Inventoried Gene P2X6 Assay ID: Hs01003997_m1
TaqMan Gene Expression Assay-Inventoried Gene P2X7 Assay ID: Hs00175721_m1
TaqMan Gene Expression Assay Inventoried Gene P2Y1 Assay ID: Hs 00704965_s1
TaqMan Gene Expression Assay-Inventoried Gene P2Y2 Assay ID: Hs00175732_m1
TaqMan Gene Expression Assay-Inventoried Gene P2Y4 Assay ID: Hs00267404_s1
TaqMan Gene Expression Assay-Inventoried Gene P2Y6 Assay ID: Hs00602548_m1
TaqMan Gene Expression Assay Inventoried Gene P2RY11 Assay ID: Hs01038858_m1
TaqMan Gene Expression Assay Inventoried Gene P2Y12 Assay ID: Hs00224470_m1
TaqMan Gene Expression Assay Inventoried Gene P2Y13 Assay ID: Hs03043902_s1
TaqMan Gene Expression Assay Inventoried Gene P2Y14 Assay ID: Hs00208434_m1

Tabella 2. Primer utilizzati durante la RT-PCR

5. Analisi degli ioni Calcio intracitoplasmatici.

Gli ioni calcio, oltre a partecipare all'equilibrio osmotico della cellula, rappresentano un'importante classe di secondi messaggeri, molecole che permettono la traduzione citoplasmatica di segnali generati da recettori di membrana. In condizioni basali, le concentrazioni del calcio citoplasmatico si mantengono molto basse, ma tendono ad aumentare significativamente in seguito a stimolazione. Anche i recettori della famiglia P2 utilizzano come secondo messaggero il calcio citosolico. In questo studio la concentrazione degli ioni calcio in seguito a stimolazione con ATP, UTP o BzATP è stata studiata grazie al colorante FURA-2/AM, un derivato benzofuranico che agisce come chelante ad alta affinità degli ioni calcio. La formazione del complesso (in rapporto stechiometrico 1:1) induce una modifica nella struttura del colorante, associata all'emissione di fluorescenza, il cui incremento è direttamente proporzionale alla concentrazione intracitoplasmatica di calcio nella cellula.

Le cellule sono state risospese, alla concentrazione di 10^7 /mL in una soluzione salina standard (125 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, , 5.5 mM glucosio, 1 mM NaHPO₄, 5 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂ e 20 mM HEPES a Ph 7.4) e incubate con FURA-2/AM (4 μM; Sigma Aldrich) e Sulfinilpirazone (250 μM; Sigma Aldrich). Quest'ultimo causa il blocco dei pori cellulari, consentendo la compartimentazione del calcio citosolico all'interno della cellula. Al termine dell'incubazione (20 minuti a 37°C), le cellule sono state analizzate mediante

fluorimetro (LS50 Perkin Elmer) al rapporto di eccitazione 340/380 e con una lunghezza d'onda di emissione: 510 nm. La concentrazione di Ca²⁺ ottenuta è stata calcolata mediante utilizzo del software di analisi FL WinLab3.0 (PerkinElmer).

6. Studi di microarrays

Cellule leucemiche derivate da sangue periferico di 12 pazienti con LAM e progenitori emopoietici CD34⁺ isolati da 3 donatori sani sono stati risospesi, rispettivamente, in terreno IMDM 10% FBS e DMEM 10% FBS alla concentrazione di 1x10⁶ cellule/ml e trattati con 1mM ATP per 24 ore. L'RNA totale è stato estratto dai tutti i campioni cellulari utilizzando RNeasy Mini Kit (QIAGEN), secondo il protocollo della ditta fornitrice. L'RNA Chip, Agilent RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies) è stato utilizzato per valutare la purezza e l'integrità dei campioni estratti utilizzando un Bioanalyzer Agilent 2100. Uno spettrofotometro NanoDrop ND-1000 è stato utilizzato per quantificare la concentrazione dell'RNA estratto [59]. Per le reazioni di sintesi dei target, così come per le reazioni di ibridizzazione su Affymetrix HG-U133 Plus2 GeneChip, la marcatura e l'analisi sono stati utilizzati i protocolli standard forniti da Affymetrix. La quantità di RNA totale di partenza è stata 1µg. I dati raccolti sono stati depositati nel database pubblico Gene Expression Omnibus MIAME (<http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30903>).

L'algoritmo utilizzato per l'analisi assoluta del quantitativo di mRNA trascritto (signal) è stato il GeneChip Operating Software, l'algoritmo comparativo è stato utilizzato per confrontare l'espressione genica dei campioni trattati rispetto ai non trattati (signal-log ratio). I geni differenzialmente espressi sono stati selezionati tra le sequenze che risultavano avere un signal-log ratio medio $\leq -0,5$ oppure $\geq 0,5$ nel confronto accoppiato tra trattato e non trattato.

Il software DAVID Version 6.7 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) è stato utilizzato per analizzare la lista dei geni ed identificare la prevalenza di specifiche classi funzionali, in accordo con la classificazione Gene-Ontology.

7. Saggi clonogenici

L'utilizzo dei saggi clonogenici permette di quantificare la capacità delle cellule studiate di dare origine a progenitori emopoietici commissionati. In questo studio abbiamo valutato la capacità clonogenica delle cellule leucemiche (CFU-L) e delle cellule CD34⁺ normali (CFU-C) in presenza di dosi crescenti di ATP e UTP. A tale scopo 1×10^5 blasti leucemici o 1×10^3 CD34⁺ normali sono state seminate in terreno semisolido (MethoCult SFBIT H4236; StemCell Technologies) con aggiunta di citochine: 50 ng/mL di SCF, 50 ng/mL di IL-3 e 10 ng/mL di GM-CSF (tutte ThermoFisherScientific) con o senza nucleotidi. Dopo 10-12 giorni di coltura a 37°C con 5% CO₂, le piastre di coltura sono state

analizzate mediante microscopio invertito e si è proceduto alla conta delle colonie. E' stata considerata "colonia" un aggregato di almeno 50 cellule.

I risultati sono stati espressi come fold-change del numero di colonie rispetto al controllo non trattato.

8. Saggi di proliferazione

Al fine di valutare gli effetti della presenza dei nucleotidi sulla proliferazione cellulare delle cellule leucemiche e delle CD34⁺ normali, abbiamo allestito saggi di proliferazione in coltura liquida. La proliferazione è stata valutata mediante metodo colorimetrico utilizzando il kit CellTiter 96AQueousOne Solution Proliferation Assay di Promega. Questo saggio colorimetrico sfrutta la riduzione, da parte delle deidrogenasi mitocondriali attive in cellule vive, del composto tetrazolico MTS (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H-tetrazolio) nel prodotto colorato formazano. La quantità di formazano prodotta presente nel terreno di coltura viene rilevata mediante valutazione dell'assorbanza a 490nm, utilizzando il lettore ELISA Multiskan EX (Thermo Scientific) La quantità di formazano prodotta viene poi correlata al numero di cellule vitali presenti nel pozzetto.

Brevemente, le cellule sono state risospese alla concentrazione di 5×10^4 /100 μ l di terreno IMDM 10%FBS con aggiunta di citochine (SCF 50 ng/ml , IL3 50 ng/ml , GM-CSF 10ng/ml) e incubate overnight a 37°C. Al termine dell'incubazione le

cellule sono state trattate per 48 ore con 1mM ATP. Per dimostrare che gli effetti osservati fossero effettivamente dovuti all'ATP, abbiamo aggiunto alla coltura un enzima che idrolizza l'ATP, l'apirasi (1U/ml) nella forma attiva e denaturata (Sigma-Aldrich). Al termine del trattamento, abbiamo aggiunto 20 µl di soluzione *Cell Titer 96® AQueous One Solution Reagent* a ciascun pozzetto e dopo 4 ore di incubazione abbiamo proceduto con la lettura.

9. Apoptosi

Per valutare gli effetti tossici del trattamento con nucleotidi abbiamo utilizzato il kit Annexin-V FLUOS Staining kit (Roche Diagnostic, Germania). Grazie all'elevata affinità dell'Annessina-V per le fosfatidilserine (PS), questo test permette di marcare i residui di PS che vengono esposti sulla membrana cellulare durante le fasi iniziali del processo apoptotico. Anche le cellule necrotiche mostrano residui di PS sulla membrana cellulare ma, avendo perso l'integrità delle proprie membrane, incorporano lo Ioduro di Propidio (PI) permettendo così di essere distinte dalle cellule apoptotiche. Sarà quindi possibile ottenere un profilo citofluorimetrico che distinguerà tre popolazioni: le cellule vitali, negative sia per l'Annessina-V che per il PI; le cellule apoptotiche, positive solo per l'Annessina-V e le cellule necrotiche, positive sia per l'Annessina-V che per il PI.

Brevemente, le cellule sono state tenute in coltura alla concentrazione finale di 1×10^6 /ml di terreno IMDM 10% FBS in presenza di dosi crescenti di ATP (1mM, 2mM, 5mM) per 24h, 48h e 72h. Al termine delle varie incubazioni le cellule sono state lavate con PBS e marcate con la soluzione di staining prevista dal kit utilizzato (per un milione di cellule 100 μ l soluzione così composta: 1000 μ l buffer, 20 μ l Annessina V, 20 μ l propidio) per 15 minuti al buio a T. A.

I campioni sono stati analizzati utilizzando il citofluorimetro FacsCantoII (*Beckton Dickinson, USA*) e il software BD FACSDiva 6.0 e il software FCSExpress4 (*DeNovo Software*).

10. Ciclo cellulare

Per studiare i cambiamenti nella distribuzione del ciclo cellulare delle cellule leucemiche in seguito a trattamento con nucleotidi, abbiamo utilizzato la tecnica dell'Acridine Orange (AO).

L'Acridine Orange è un colorante fluorescente che si lega agli acidi nucleici e per questo lo rende utile per la determinazione del ciclo cellulare. Questa sostanza penetra all'interno delle membrane cellulari e si lega all'RNA per attrazione elettrostatica oppure si intercala nel DNA. Quando è legato all'DNA emette una fluorescenza verde, simile al FITC (max eccitazione 502 nm e max emissione a 525 nm); quando si lega all'RNA emette una fluorescenza rossa (max eccitazione 460 nm e max emissione 650 nm) Questa sua caratteristica permette di discriminare gli acidi nucleici e distinguere le varie fasi del ciclo cellulare. La percentuale di cellule in G0/G1, S e G2M

è stata determinata misurando contemporaneamente il contenuto cellulare totale di DNA e RNA, secondo la metodica precedentemente descritta [60] [61]. Dopo l'acquisizione mediante citofluorimetro FACSCantoII (Becton Dickinson) , la distribuzione del ciclo cellulare è stata analizzata mediante il software ModFit LT 3.0 (Verity Software House).

11. Saggi di migrazione

I saggi di migrazione in vitro utilizzati in questo studio si ispirano al modello delle Boyden chambers. Questo sistema, introdotto originariamente da Boyden per lo studio della chemiotassi leucocitaria, si basa sull'utilizzo di una camera di coltura, separata in due compartimenti distinti, ma comunicanti tra di loro attraverso una membrana semipermeabile. Il sistema è costituito da due pozzetti: quello superiore, in cui vengono seminate le cellule di cui si vuole studiare il comportamento migratorio, e il pozzetto inferiore, contenente una o più chemiotassine. I due pozzetti sono separati tra di loro da una membrana di porosità variabile, a seconda delle dimensioni delle cellule in esame. In questo studio, la migrazione dei blasti leucemici è stata studiata utilizzando il piastre transwell del diametro di 6.5nm, con una membrana di porosità 8 µm (Costar). Cellule leucemiche ottenute da 7 campioni di AML sono state risospese alla concentrazione di 1×10^6 /ml di terreno IMDM e incubate *overnight* a 37°C, 5% CO2 in presenza o assenza di 1mM UTP, 1mM ATP o di analoghi stabili (500

ng/ml INS415, 100ng/ml INS45973). Al termine dell'incubazione, e prima dell'allestimento del saggio di migrazione, le cellule sono state lavate e risospese in terreno IMDM in assenza di nucleotidi. In particolare, 1×10^5 cellule sono state risospese in 100 μ L di terreno IMDM e sono state introdotte nel pozzetto superiore, mentre nella camera inferiore sono stati aggiunti 600 μ L di terreno IMDM, con o senza 150 ng/mL CXCL12 (Biodesign International).

Al termine di un'incubazione *overnight* a 37°C, 5% CO₂, è stata rimossa la camera superiore del transwell e le cellule migranti (camera inferiore) sono state raccolte e contate mediante l'utilizzo di un microscopio invertito (Nikon). La percentuale di migrazione è stata calcolata nel seguente modo: cellule migranti/cellule seminate x 100. I risultati sono espressi come fold-change della percentuale di migrazione di ciascun campione rispetto alla migrazione nel controllo non trattato.

Le concentrazioni utilizzate di nucleotidi o di analoghi dinucleotidici sono state dedotte da preliminari esperimenti di dose-risposta (non mostrati).

12. Esperimenti di xenotrapianto

Per tutti gli esperimenti *in vivo* eseguiti in questo studio sono stati utilizzati topi NOD.cg-PrkdcscidII2rgtm1Wjll (NSG) acquistati presso il Jackson Laboratory. I trapianti sono stati effettuati in topi femmine di 5-6 settimane, precedentemente irradiati con dosi subletali di cesio 137 (240 cGy)

12.1 Saggi di Homing

Per valutare la capacità dei nucleotidi trifosfati di influenzare l'homing di cellule leucemiche, cellule leucemiche primarie sono state trattate ex-vivo con 1mM ATP, 1mM UTP, 500nM INS415 e 100nM INS45973 per 24 ore a 37°C con 5% CO₂ e successivamente inoculate nella vena caudale di topi NSG immunocompromessi. Cinque topi per condizione di trattamento sono stati inoculati con 10x10⁶ di cellule trattate e 16 ore dopo il trapianto i topi sono stati sacrificati. Per valutare la percentuale di cellule umane migrate nel midollo dei topi riceventi, sono state isolate le cellule mononucleate dal midollo delle ossa lunghe e successivamente marcate con un anticorpo monoclonale contro l'antigene umano hCD45 (Becton Dickinson). Mediante analisi citofluorimetrica, è stata analizzata la percentuale di homing midollare valutata come percentuale di cellule hCD45 positive presenti nel midollo.

12.2 Saggi di engraftment

Oltre ai saggi di homing, abbiamo effettuato una valutazione degli effetti del trattamento con nucleotidi sulla capacità di engraftment a lungo termine delle cellule leucemiche trapiantate in un modello murino. A tale scopo sono state trattate ex-vivo per 24 ore con 1mM ATP, 1mM UTP blasti leucemici e cellule staminali leucemiche purificate secondo la metodica sopra descritta. Al termine del trattamento le cellule sono state lavate e inoculate nella vena caudale di

topi immunocompromessi. Ciascun topo è stato inoculato con $25 \pm 15 \times 10^6$ blasti leucemici o con 105.300 ± 136.686 cellule staminali leucemiche CD38-CD34⁺.

Sono stati individuati 5 gruppi formati da 5 topi ciascuno: un gruppo di topi di controllo inoculato con sola fisiologica, un gruppo inoculato con cellule non trattate, un gruppo inoculato con cellule trattate con ATP, uno inoculato con cellule trattate con UTP, un quinto gruppo inoculato con cellule trattate sia con ATP che UTP. A causa dell'esiguo numero di cellule disponibili, negli esperimenti in cui sono state inoculate staminali leucemiche, si è preferito eliminare il quinto gruppo sperimentale.

Otto settimane dopo il trapianto, i topi sono stati sacrificati e l'attecchimento di cellule umane è stata valutato mediante analisi citofluorimetrica delle cellule midollari ottenute dopo "bone flushing". Brevemente, le cellule sono state marcate con un anticorpo monoclonale anti-hCD45, previa lisi dei globuli rossi, la sospensione cellulare è stata analizzata utilizzando un citofluorimetro FACSCantoII (Becton Dickinson). Appropriati controlli isotipici sono stati effettuati. Una marcatura con 7-amminoactinomycin D (Sigma-Aldrich) è stata utilizzata per discriminare le cellule vitali da quelle apoptotiche.

12.3 Trattamento farmacologico in vivo

Per valutare il possibile effetto farmacologico dei nucleotidi, abbiamo deciso di trattare *in vivo* con ATP i topi ai quali era stata indotta una leucemia umana.

Per disegnare lo schema di trattamento ci siamo basati su alcuni lavori pubblicati in letteratura, in cui veniva utilizzato ATP per il trattamento di tumori solidi [62] [63] [64]. Utilizzando topi NSG di 6 settimane abbiamo valutato la tossicità di iniezioni giornaliere di 100mM ATP per via intraperitoneale, eseguite per 15 giorni di trattamento [65]. I topi di controllo sono stati inoculati con soluzione fisiologica, con le stesse modalità dei topi trattati. Dopo 15 giorni, i topi sono stati sacrificati e mediante prelievo di sangue periferico è stato valutato l'emocromo.

Per indurre una leucemia umana nei topi da trattare, sono state inoculate nella vena caudale di topi immunodepressi 1×10^6 cellule leucemiche, ottenute da sangue periferico di pazienti con LAM alla diagnosi, risospese in 200 μ l di soluzione fisiologica. Successivamente i topi sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali. Nel primo gruppo di esperimenti abbiamo valutato gli effetti del trattamento con ATP sullo sviluppo della leucemia appena indotta. A tale scopo, a partire dal giorno seguente al trapianto e per i 30 giorni successivi, 5 topi sono stati trattati a giorni alterni con 100mM ATP per via intraperitoneale.

Nel secondo gruppo di esperimenti abbiamo valutato gli effetti del trattamento con ATP sulla progressione tumorale di una leucemia già sviluppata, ossia abbiamo proceduto con il trattamento nel momento in cui l'attecchimento di cellule umane è risultato significativo. A tale scopo, 5 topi sono stati trattati per 30 giorni a giorni alterni con 100mM ATP per via intraperitoneale a partire dal giorno in cui l'attecchimento di cellule umane è risultato positivo all'analisi

citofluorimetrica (positività per hCD5). Per ciascun gruppo, 5 topi di controllo sono stati inoculati con soluzione fisiologica secondo lo stesso schema di trattamento.

Per monitorare l'attecchimento delle cellule leucemiche in entrambi i gruppi sperimentali mediante analisi citofluorimetrica, sono stati eseguiti prelievi di sangue periferico una volta al mese per i 4 mesi successivi alla fine del trattamento. Brevemente, le cellule sono state marcate con anticorpi monoclonali anti-human CD45 e anti-mouse CD45. La 7- aminoactinomycin D (7-AAD) è stata utilizzata per discriminare le cellule vitali dalle apoptotiche o morte.

Per queste analisi è stato utilizzato un citofluorimetro FACSAria (Becton Dickinson) e il software FACSDiva.

13. Analisi statistica dei dati

I risultati sono stati espressi come media \pm errore standard di almeno tre esperimenti distinti.

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software di analisi dati GraphPad Prism5 (GraphPad Software) mediante il test *t di Student* e l'analisi di varianza ANOVA. Tutti i valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati

1. *Le cellule leucemiche di LAM esprimono i recettori purinergici P2*

Prima di poter valutare i possibili effetti dell'esposizione ai nucleotidi sulla funzionalità delle cellule leucemiche, siamo andati a caratterizzare l'espressione degli specifici recettori ai quali si legano i nucleotidi, ossia i recettori purinergici P2.

L'espressione dei 15 sottotipi recettoriali P2X e P2Y ad oggi clonati è stata analizzata in due linee cellulari di leucemia umana, U937 e OCI-AML3, e in 15 campioni primari di blasti leucemici alla diagnosi. Per standardizzare l'analisi e poter confrontare i vari campioni, è stato utilizzato un mRNA universale come riferimento. Inoltre i campioni leucemici sono stati confrontati con campioni di cellule staminali normali CD34⁺.

Il livello di espressione degli mRNA dei geni che codificano per i vari recettori è stato valutato mediante RealTime qRT-PCR come precedentemente descritto.

Come mostrato dalla figura 1 A-B, entrambe le linee cellulari U937 e OCI-AML3 esprimono i recettori P2X1, P2X4 e P2X7. Mentre la linea U937 esprime tutti i sottotipi recettoriali P2Y, la linea OCI-AML3 non risulta esprimere i recettori P2Y1 e P2Y12. Per quanto riguarda l'espressione dei recettori nei campioni primari (figura 1 C-D), risultano essere espressi i sottotipi recettoriali P2X1, P2X5, P2X5 e P2X7; mentre non sono stati rilevati livelli significativi dei recettori P2X2, P2X3 E P2X6. Dal confronto con la controparte normale, risulta una significativa espressione differenziale del recettore P2X7 ($p < 0.05$), che nelle

cellule leucemiche risulta essere over-espresso. Per quanto riguarda l'espressione dei recettori P2Y, le cellule leucemiche risultano esprimere tutti i recettori ad oggi conosciuti eccetto il recettore P2Y6. Non sono state rilevate differenze significative rispetto alla controparte normale.

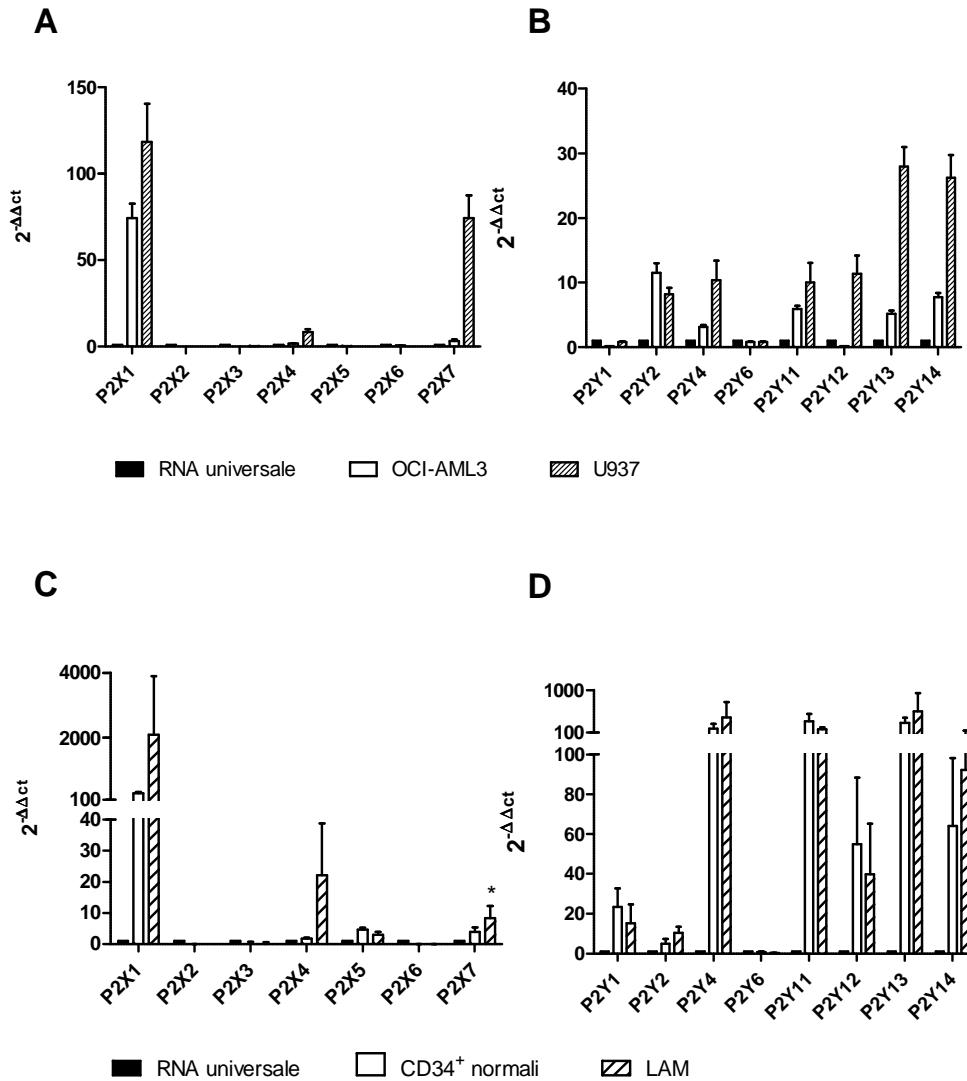


Figura 1 Le cellule di LAM esprimono i recettori P2. Espressione del mRNA dei vari sottotipi recettoriali P2X e P2Y nelle linee cellulari U937 e OCI-AML3 (A-B) e nelle cellule primarie di leucemia acuta mieloide (C-D). mRNA universale è stato utilizzato come riferimento e posto uguale a 1. *P<0.05

2. I recettori P2 espressi dalle cellule di LAM sono funzionalmente attivi.

Tra gli effetti biologici più precoci associati alla stimolazione dei recettori P2 vi è l'apertura dei canali per il calcio, con conseguente innalzamento della loro concentrazione intracitoplasmatica. Per misurare le variazioni della concentrazione di calcio intracellulare ($[Ca^{2+}]_i$) indotte dai nucleotidi, le cellule leucemiche sono state marcate con l'indicatore fluorescente del Ca^{2+} , Fura-2/AM, come descritto nei materiali e metodi, e stimulate con ATP, con un analogo stabile dell'ATP, il BzATP e con UTP. Il flusso di calcio è stato monitorato mediante analisi fluorimetrica. Tutte le cellule dei 22 campioni analizzati sono risultate responsive alla stimolazione con ATP, anche se i picchi di risposta sono risultati essere molto variabili tra i vari soggetti (il ΔCa^{2+} , ossia la differenza tra la massima concentrazione di Ca^{2+} indotta e la concentrazione basale, è risultato avere un range molto ampio 36-334nM. La figura 2 mostra come la stimolazione con 1mM ATP induca un veloce incremento della concentrazione di Ca^{2+} preferibilmente nei campioni appartenenti ai sottotipi FAB M1, M2, M4 ed M5. E' risultato interessante notare come una concentrazione inferiore di BzATP (300 μ M) sia stata sufficiente ad indurre in tutti i campioni la stessa risposta farmacologica, in termini di incremento della concentrazione di Ca^{2+} , indotta dall'ATP. Abbiamo inoltre eseguito una curva dose risposta utilizzando tre campioni (due M5 e un M2). I risultati sono

riportati nella figura 2D per l'ATP e 2E per il BzATP. I campioni sono risultati essere responsivi alle varie dosi di ATP e BzATP, anche se con una cinetica di risposta diversa. Il campione che è risultato rispondere maggiormente all'ATP, lo è stato anche per il BzATP. Tutti i campioni di LAM testati hanno risposto alla stimolazione con UTP (figura 2C).

Questi dati nel complesso dimostrano che le cellule leucemiche di LAM esprimono recettori P2 funzionalmente attivi e che l'ATP, e in minor misura, l'UTP attivano il signaling regolato da tali recettori.

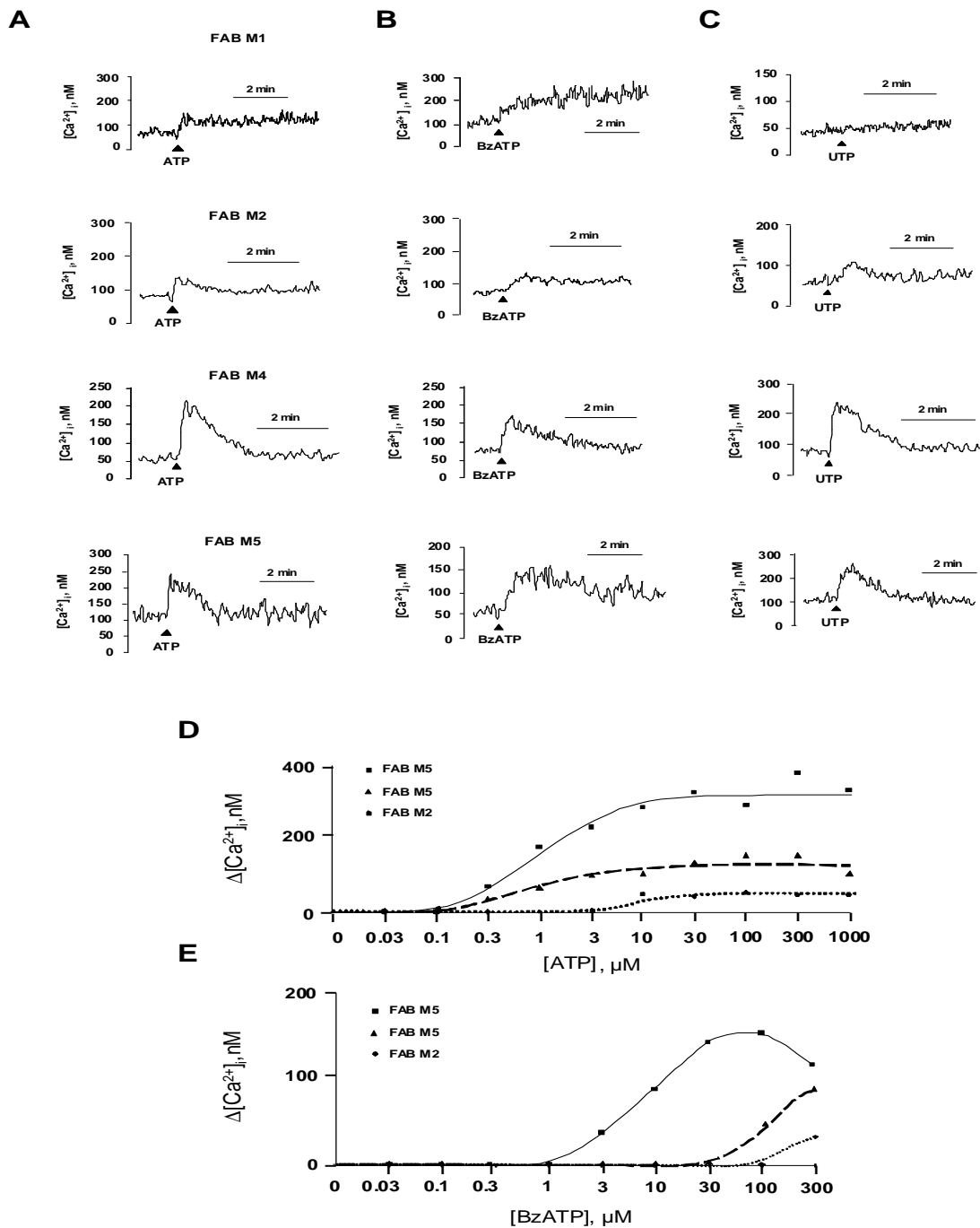


Figura 2 ATP, UTP e BzATP inducono un incremento della concentrazione di Ca^{2+} nelle cellule di LAM. Cellule leucemiche sono state marcate con l'indicatore fluorescente Fura-2AM. Cellule provenienti dallo stesso campione campione sono state stimulate con 1mM ATP (A), 300 μM BzATP (B), oppure 1mM UTP (C). Il triangolo nero indica l'aggiunta del nucleotide. E' stato riportato un esperimento rappresentativo per FAB. Cellule appartenenti allo stesso campione sono state stimulate con dosi crescenti di ATP (D) o BzATP (E).

3. GEP di cellule leucemiche trattate con ATP.

Al fine di valutare quali modifiche produca la stimolazione con nucleotidi a livello biomolecolare, sono state eseguite analisi dettagliate del profilo trascrizionale di cellule trattate. Avendo osservato che in termini di variazioni del signaling del Ca^{2+} , l'ATP induceva le risposte più significative, per l'analisi del profilo di espressione genica post stimolazione abbiamo deciso di utilizzare l'ATP.

A tale scopo, il profilo trascrizionale delle cellule leucemiche trattate con ATP è stato studiato mediante l'utilizzo del GeneChip HG-U133A Plus 2 di Affymetrix. I dati emersi da tale screening sono stati filtrati con la procedura descritta nella sezione Materiali e Metodi ed è stata così identificata una serie di geni il cui profilo trascrizionale è modulato in modo significativo dal trattamento con ATP (692 geni incrementati e 520 diminuiti nel trattato vs il controllo). Al fine di attribuire un significato biologico ai dati di microarrays abbiamo classificato i geni differenzialmente espressi in categorie funzionali di Gene Ontology utilizzando il software DAVID 6.7. Le categorie maggiormente rappresentate nella lista dei geni Increased (tabella 1) sono correlate alla regolazione del ciclo cellulare, quali ad esempio "regulation of cell proliferation", "negative regulation of cell proliferation" e "regulation of progression through cell cycle", e ai processi di migrazione cellulare, ad

esempio “negative regulation of cell-matrix adhesion”, “negative regulation of cell subset adhesion” e “cell migration”. Al contrario, nella lista dei geni Decreased (tabella 2) risultano maggiormente rappresentate categorie funzionali quali “positive regulation of cell proliferation” and “cell cycle”.

Tabella 1. Categorie GO incrementate in cellule trattate con ATP

Term	p
GO:0002376~immune system process	6,00E+03
GO:0009611~response to wounding	6,32E+03
GO:0009605~response to external stimulus	1,50E+04
GO:0006955~immune response	6,32E+04
GO:0006950~response to stress	2,71E+05
GO:0010941~regulation of cell death	1,74E+06
GO:0006954~inflammatory response	4,12E+06
GO:0012501~programmed cell death	1,87E+07
GO:0006952~defense response	2,26E+07
GO:0050896~response to stimulus	1,37E+09
GO:0040011~locomotion	4,68E+09
GO:0002682~regulation of immune system process	5,76E+09
GO:0002696~positive regulation of leukocyte activation	9,54E+09
GO:0045597~positive regulation of cell differentiation	1,21E+10
GO:0006935~chemotaxis	1,36E+10
GO:0042330~taxis	1,36E+10
GO:0050793~regulation of developmental process	1,87E+10
GO:0045595~regulation of cell differentiation	2,36E+10
GO:0051094~positive regulation of developmental process	3,82E+10
GO:0051239~regulation of multicellular organismal process	5,42E+10
GO:0048585~negative regulation of response to stimulus	6,26E+10
GO:0050727~regulation of inflammatory response	7,72E+10
GO:0051302~regulation of cell division	8,20E+10
GO:0042127~regulation of cell proliferation	1,11E+11
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	1,82E+11
GO:0001817~regulation of cytokine production	2,84E+11
GO:0001819~positive regulation of cytokine production	2,86E+11
GO:0010646~regulation of cell communication	3,07E+11

GO:0045766~positive regulation of angiogenesis	3,23E+11
GO:0050714~positive regulation of protein secretion	3,87E+11
GO:0031347~regulation of defense response	6,22E+11
GO:0007165~signal transduction	7,30E+11
GO:0050728~negative regulation of inflammatory response	7,57E+11
GO:0016477~cell migration	9,62E+11
GO:0007626~locomotory behavior	1,01E+12
GO:0048583~regulation of response to stimulus	1,30E+12
GO:0002694~regulation of leukocyte activation	1,71E+12
GO:0002237~response to molecule of bacterial origin	2,02E+12
GO:0051249~regulation of lymphocyte activation	2,19E+12
GO:0009966~regulation of signal transduction	2,58E+12
GO:0051047~positive regulation of secretion	2,70E+12
GO:0051046~regulation of secretion	3,47E+12
GO:0045639~positive regulation of myeloid cell differentiation	0.001017437209948944
GO:0051674~localization of cell	0.00111722033080268
GO:0048870~cell motility	0.00111722033080268
GO:0050867~positive regulation of cell activation	0.001324224367673155
GO:0019221~cytokine-mediated signaling pathway	0.0013478690582334118
GO:0007243~protein kinase cascade	0.0014296785202746168
GO:0051051~negative regulation of transport	0.0014511740963131382
GO:0031348~negative regulation of defense response	0.0015246351600327786
GO:0030099~myeloid cell differentiation	0.0016671104614578156
GO:0042035~regulation of cytokine biosynthetic process	0.0018663705124167254
GO:0009617~response to bacterium	0.0022781339042815905
GO:0032496~response to lipopolysaccharide	0.002347629288218415
GO:0009968~negative regulation of signal transduction	0.0024785504306959172
GO:0050708~regulation of protein secretion	0.002484600110993725
GO:0010648~negative regulation of cell communication	0.002515830914800967
GO:0060341~regulation of cellular localization	0.002515830914800967
GO:0034097~response to cytokine stimulus	0.0027180562377339536
GO:0045086~positive regulation of interleukin-2 biosynthetic process	0.00320124449971939
GO:0030218~erythrocyte differentiation	0.0033993839357592485
GO:0002274~myeloid leukocyte activation	0.004568348169828342
GO:0002684~positive regulation of immune system process	0.004659019507416238
GO:0032663~regulation of interleukin-2 production	0.005300050765182001
GO:0006909~phagocytosis	0.005490812948307443
GO:0034101~erythrocyte homeostasis	0.005998133473329092
GO:0030308~negative regulation of cell growth	0.0063263015053711385
GO:0045637~regulation of myeloid cell differentiation	0.006349581230567847
GO:0010627~regulation of protein kinase cascade	0.006745918404326491
GO:0051050~positive regulation of transport	0.007210948885076143
GO:0030154~cell differentiation	0.007811984392656083

GO:0043277~apoptotic cell clearance	0.007953160792039417
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0.008286553867388122
GO:0030162~regulation of proteolysis	0.00835842413319337
GO:0048534~hemopoietic or lymphoid organ development	0.009524167225707886
GO:0051048~negative regulation of secretion	0.009750944687967418
GO:0045076~regulation of interleukin-2 biosynthetic process	0.009759780062415447
GO:0048008~platelet-derived growth factor receptor signaling pathway	0.009759780062415447
GO:0002819~regulation of adaptive immune response	0.0105036146594802
GO:0030097~hemopoiesis	0.011034120034504286
GO:0009967~positive regulation of signal transduction	0.01115837600561601
GO:0030595~leukocyte chemotaxis	0.011216709315535011
GO:0051607~defense response to virus	0.011282747769979567
GO:0000165~MAPKKK cascade	0.012750487714332234
GO:0045321~leukocyte activation	0.013248980253993542
GO:0060326~cell chemotaxis	0.01346198511812606
GO:0007259~JAK-STAT cascade	0.01346198511812606
GO:0002683~negative regulation of immune system process	0.014160964589280109
GO:0045596~negative regulation of cell differentiation	0.014489879131603746
GO:0007599~hemostasis	0.014628106245699475
GO:0032944~regulation of mononuclear cell proliferation	0.014954845728465845
GO:0070663~regulation of leukocyte proliferation	0.014954845728465845
GO:0002520~immune system development	0.015074506024310519
GO:0009615~response to virus	0.015324028278105323
GO:0045926~negative regulation of growth	0.016043191269159193
GO:0050715~positive regulation of cytokine secretion	0.01663288646933249
GO:0051049~regulation of transport	0.01673692736761895
GO:0040008~regulation of growth	0.016829394483609646
GO:0045619~regulation of lymphocyte differentiation	0.016906622311466078
GO:0006469~negative regulation of protein kinase activity	0.017520941657747882
GO:0001558~regulation of cell growth	0.01782011655786037
GO:0032673~regulation of interleukin-4 production	0.01820696775742895
GO:0043124~negative regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	0.01820696775742895
GO:0045859~regulation of protein kinase activity	0.018443169950505645
GO:0051223~regulation of protein transport	0.019159799946979618
GO:0050776~regulation of immune response	0.019568721841990232
GO:0033673~negative regulation of kinase activity	0.020374379120938174
GO:0051093~negative regulation of developmental process	0.02144288505784326
GO:0033138~positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	0.022404615658090897
GO:0001953~negative regulation of cell-matrix adhesion	0.022404615658090897
GO:0043549~regulation of kinase activity	0.02412761907875339
GO:0043388~positive regulation of DNA binding	0.02548139182491982
GO:0051101~regulation of DNA binding	0.02559276534287474
GO:0045648~positive regulation of erythrocyte differentiation	0.026958234048129297

GO:0010812~negative regulation of cell-substrate adhesion	0.026958234048129297
GO:0043410~positive regulation of MAPKKK cascade	0.026987756159395453
GO:0042108~positive regulation of cytokine biosynthetic process	0.026987756159395453
GO:0051348~negative regulation of transferase activity	0.02699365041223686
GO:0051726~regulation of cell cycle	0.02745484739286467
GO:0040017~positive regulation of locomotion	0.029482674115649206
GO:0051272~positive regulation of cell motion	0.029482674115649206
GO:0050921~positive regulation of chemotaxis	0.03092138576301189
GO:0048821~erythrocyte development	0.03184860389546587
GO:0050707~regulation of cytokine secretion	0.03376820076263927
GO:0007050~cell cycle arrest	0.03635056203755649
GO:0051090~regulation of transcription factor activity	0.03635056203755649
GO:0050920~regulation of chemotaxis	0.036746252426957116
GO:0042509~regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein	0.036746252426957116
GO:0010324~membrane invagination	0.03787832013685326
GO:0006897~endocytosis	0.03787832013685326
GO:0045786~negative regulation of cell cycle	0.043815400117242206
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	0.04621409428405894
GO:0002695~negative regulation of leukocyte activation	0.04649253616892068
GO:0050900~leukocyte migration	0.04649253616892068
GO:0010740~positive regulation of protein kinase cascade	0.04651183399249789
GO:0045087~innate immune response	0.04698008373858133
GO:0045835~negative regulation of meiosis	0.04704062799591948
GO:0045402~regulation of interleukin-4 biosynthetic process	0.04704062799591948
GO:0045404~positive regulation of interleukin-4 biosynthetic process	0.04704062799591948
GO:0002687~positive regulation of leukocyte migration	0.04835852431316829
GO:0046627~negative regulation of insulin receptor signaling pathway	0.04835852431316829
GO:0032642~regulation of chemokine production	0.04835852431316829

Tabella 2. Categorie GO *down-regolate* in cellule trattate con ATP

Term	P
GO:0002376~immune system process	1,80E+05
GO:0006955~immune response	5,51E+05
GO:0034470~ncRNA processing	2,53E+09
GO:0002504~antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II	7,08E+10
GO:0006952~defense response	9,13E+10
GO:0048534~hemopoietic or lymphoid organ development	6,45E+11
GO:0030097~hemopoiesis	7,37E+11
GO:0006954~inflammatory response	8,66E+11
GO:0007049~cell cycle	1,74E+12
GO:0002520~immune system development	0.001162220676517164
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	0.001518360340919611
GO:0009605~response to external stimulus	0.0018092625612832504
GO:0045321~leukocyte activation	0.002724745137341466
GO:0010324~membrane invagination	0.003453456492225448
GO:0006897~endocytosis	0.003453456492225448
GO:0006909~phagocytosis	0.003909959577156714
GO:0009168~purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	0.006701447487562781
GO:0009127~purine nucleoside monophosphate biosynthetic process	0.006701447487562781
GO:0002521~leukocyte differentiation	0.008316444149766731
GO:0009126~purine nucleoside monophosphate metabolic process	0.009064356114145173
GO:0009167~purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	0.009064356114145173
GO:0050896~response to stimulus	0.010806689071230224
GO:0002694~regulation of leukocyte activation	0.011121919800752084
GO:0019886~antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class II	0.012333067900902347
GO:0002495~antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class II	0.012333067900902347
GO:0009611~response to wounding	0.013404625572918221
GO:0050865~regulation of cell activation	0.015281952953418932
GO:0008283~cell proliferation	0.016283332570303025
GO:0007159~leukocyte adhesion	0.022904215343086072

L'analisi dei geni differenzialmente espressi ha mostrato l'induzione da parte dell'ATP dell'espressione di geni correlati al blocco del ciclo cellulare e inibitori del ciclo cellulare (CDNK1A/p21 waf1, G0S2, BTG₁ E BTG₃, figura 3), così come di fattori di trascrizione coinvolti nella proliferazione cellulare (MYB, MYC, GF11). Sono stati down-regolati dal trattamento geni correlati con la progressione del ciclo cellulare, come le cicline e le CDKs (CCNA1, CDK4). Anche il pathway di MAPK è risultato inibito. Risulta aumentata anche la trascrizione di numerosi geni (BN1P3, BN1P3L, CRADD, CASP5 e TNFRSF21) [66] [67], la cui espressione è richiesta per l'induzione di morte cellulare programmata e in maniera consistente viene diminuita la trascrizione dei geni coinvolti nell'inibizione di apoptosi (NAIP and SGK1 [68] [69]).

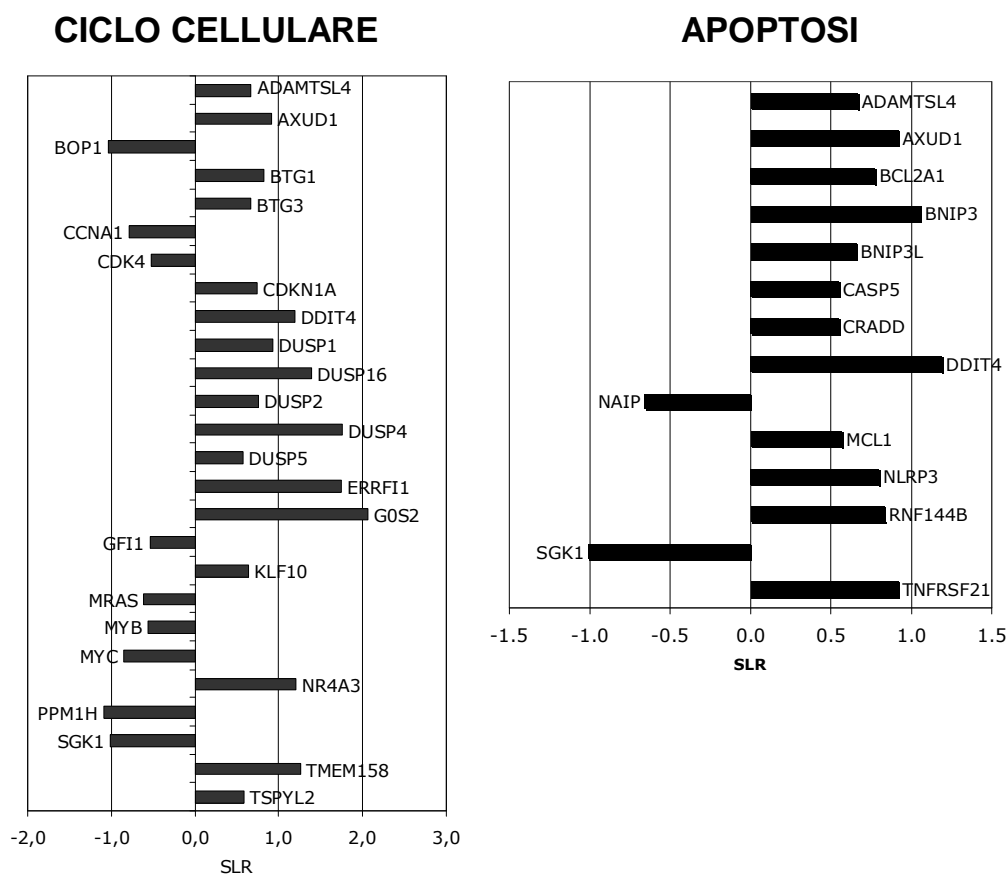


Figura 3. Analisi del profilo trascrizionale mediante microarray. Analisi mediante microarray ottenute da 12 campioni di AML (3 M0M1, 3 M2, 3 M4, 3M5). Variazioni dell'espressione genica sono stati riportati nell'asse x come signal-log ratio (SLR) confrontando cellule trattate vs cellule non trattate. (A) Regolatori del ciclo cellulare. (B) Regolatori dei processi apoptotici

Inoltre, come mostrato nella figura 4, l'esposizione ad ATP ha indotto l'espressione di geni coinvolti nella regolazione negativa della motilità cellulare (TIMP1) e inibitori dell'attività delle Rho-GTPasi (CDC42EP2, RGS1, RGS2) [70]. In maniera consistente, è inibita la trascrizione di geni attivatori della motilità cellulare (ARHG, ARHGEF10L, FGD2) [70] [71] e di geni coinvolti nella migrazione, come ad esempio enzimi che degradano la matrice (ADAM15) e

proteine del citoscheletro (NEXN, THBS3, EVL, ASNTB1, UTNR, vedi figura 4). Inoltre, le cellule trattate con ATP hanno mostrato una diminuita espressione di molte integrine (ITGA4, ITGA6, ITGAL, ITGAM) e molecole di adesione (SELPG, LGALS9, PROM1, STAB1) [72] coinvolte nell' homing e nell'engraftment cellulare.

Il profilo trascrizionale delle cellule leucemiche esposte ad ATP è stato inoltre confrontato con il profilo di espressione genica di cellule staminali normali CD34⁺, ottenute da sangue periferico di donatori sani, e trattate nelle stesse condizioni delle cellule leucemiche (ATP 1mM per 24 h). Come dimostrato nelle tabelle seguenti, il profilo di espressione genica delle cellule CD34⁺ normali trattate con ATP non è stato significativamente modificato rispetto al controllo non trattato. Nel complesso questi risultati dimostrano che l'ATP induce una significativa modulazione del profilo di espressione genica delle cellule leucemiche ma non della loro controparte normale.

HOMING ed ENGRAFTMENT

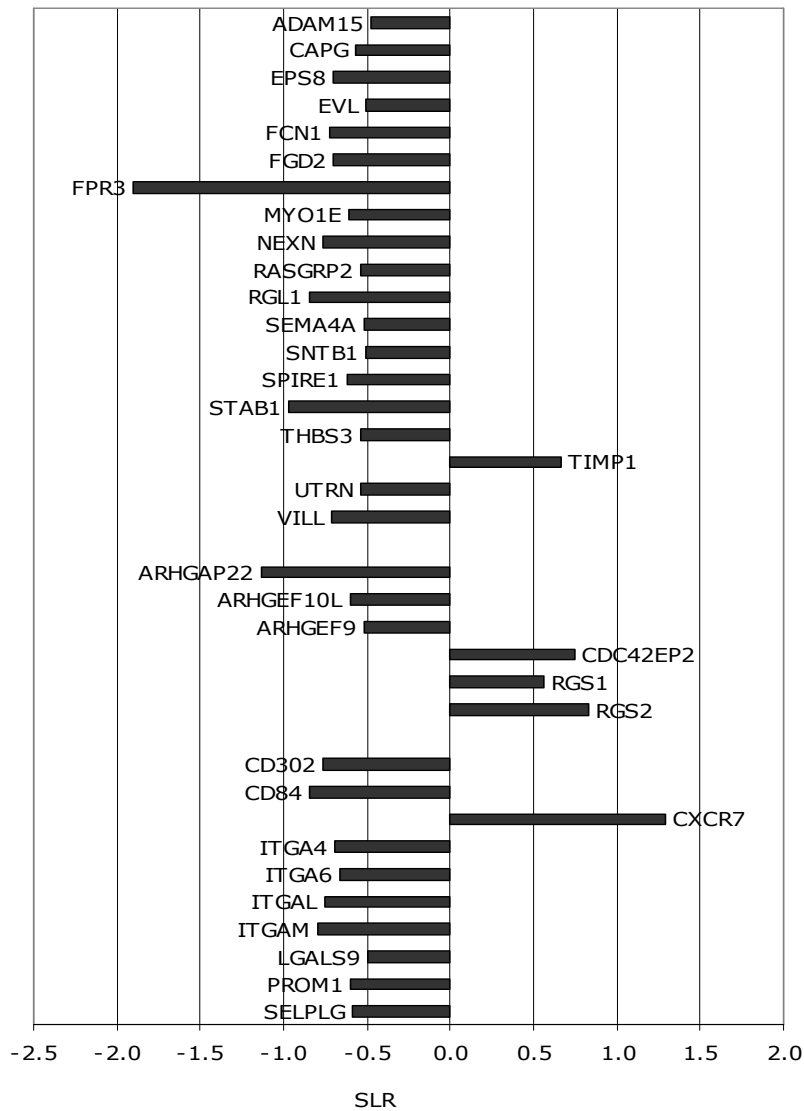


Figura 4. Analisi del profilo trascrizionale mediante microarray. Analisi mediante microarray ottenute da 12 campioni di AML (3 M0M1, 3 M2, 3 M4, 3M5). Variazioni dell'espressione genica sono stati riportati nell'asse x come signal-log ratio (SLR) confrontando cellule trattate vs cellule non trattate. Molecole di adesione e regolatori della migrazione

Tabella 3. Espressione di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare nelle cellule

CD34⁺ normali

Gene Title	Gene Symbol	CD34+ATP vs	
		CD34+ATPvsCTR SLR	CTR Change
ADAMTS-like 4	ADAMTSL4	0	NC
AXIN1 up-regulated 1	AXUD1	0,4	I
block of proliferation 1	BOP1	0,1	NC
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	BTG1	ABSENT	
BTG family, member 3	BTG3	0,2	NC
cyclin A1	CCNA1	-0,4	D
cyclin-dependent kinase 4	CDK4	0,1	NC
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CDKN1A	0,3	I
DNA-damage-inducible transcript 4	DDIT4	0,3	I
dual specificity phosphatase 1	DUSP1	ABSENT	
dual specificity phosphatase 16	DUSP16	ABSENT	
dual specificity phosphatase 2	DUSP2	0,4	I
dual specificity phosphatase 4	DUSP4	0,4	I
dual specificity phosphatase 5	DUSP5	0,5	NC
ERBB receptor feedback inhibitor 1	ERRFI1	ABSENT	
G0/G1switch 2	G0S2	0,2	I
growth factor independent 1 transcription repressor	GFI1	-0,1	NC
Kruppel-like factor 10	KLF10	0,2	I
muscle RAS oncogene homolog	MRAS	-0,2	NC
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	MYB	-0,1	NC
v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MYC	0,3	I
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	NR4A3	0,4	I
protein phosphatase 1H (PP2C domain containing)	PPM1H	-0,4	D
serum/glucocorticoid regulated kinase 1	SGK1	-0,3	D
transmembrane protein 158	TMEM158	ABSENT	
TSPY-like 2	TSPYL2	0	NC

Tabella 4. Espessione di geni coinvolti nella regolazione dell'engraftment di cellule CD34+ normali

Gene Title	Gene Symbol	CD34+ATPvsCTR SLR	CD34+ATP vs CTR Change
ADAM metallopeptidase domain 15	ADAM15	ABSENT	
Rho GTPase activating protein 22	ARHGAP22	-0,1	NC
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10-like	ARHGEF10L	ABSENT	
Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	ARHGEF9	-0,3	NC
capping protein (actin filament), gelsolin-like	CAPG	-0,2	D
CD302 molecule	CD302	-0,3	D
CD84 molecule	CD84	-0,1	NC
CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 2	CDC42EP2	ABSENT	
chemokine (C-X-C motif) receptor 7	CXCR7	-0,1	NC
epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	EPS8	ABSENT	
Enah/Vasp-like	EVL	-0,1	NC
ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	FCN1	-0,3	D
FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2	FGD2	ABSENT	
formyl peptide receptor 3	FPR3	-0,4	D
integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	ITGA4	-0,4	D
integrin, alpha 6	ITGA6	-0,3	D
integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)	ITGAL	-0,2	D
integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)	ITGAM	-0,3	NC
lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)	LGALS9	-0,1	NC
myosin IE	MYO1E	ABSENT	
nexilin (F actin binding protein)	NEXN	ABSENT	
prominin 1	PROM1	0	NC
RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)	RASGRP2	-0,4	D
ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	RGL1	-0,4	MD
regulator of G-protein signaling 1	RGS1	0,4	I
regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	RGS2	0,2	I
selectin P ligand	SELPLG	-0,1	NC
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A	SEMA4A	0,2	NC
syntrophin, beta 1 (dystrophin-associated protein A1,	SNTB1	-0,4	NC

59kDa, basic component 1)			
spire homolog 1 (Drosophila)	SPIRE1	ABSENT	
stabilin 1	STAB1	0	NC
thrombospondin 3	THBS3	-0,3	NC
TIMP metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1	0,3	I
utrophin	UTRN	-0,3	NC
villin-like	VILL	ABSENT	

4. *L'ATP inibisce la proliferazione e la capacità clonogenica di cellule leucemiche.*

Come evidenziato nel paragrafo precedente, dall'analisi trascrizionale di microarray, è emersa una significativa inibizione delle funzionalità cellulari in seguito trattamento con ATP. Questo è stato il punto di partenza per lo sviluppo di esperimenti volti a confermare a livello funzionale gli effetti osservati a livello molecolare.

Inizialmente abbiamo valutato se la presenza di ATP e UTP in coltura poteva influenzare la capacità clonogenica di cellule leucemiche. Come mostrato nella figura 5A, l'efficienza clonogenica risulta significativamente inibita dall'aggiunta di concentrazioni crescenti di ATP. L'inibizione dose-dipendente è apprezzabile già a basse concentrazioni, alla dose di 100nM ATP si ottiene una inibizione del 40% (0.62 ± 0.10 fold-change, $p < 0.05$) per arrivare poi ad un 67% alla dose 100 μ M ATP (0.33 ± 0.08 fold-change, $p < 0.0001$). Alla concentrazione massima testata di 1mM, la capacità clonogenica risulta completamente abolita.

Dal confronto con la controparte normale, possiamo osservare come le CD34⁺ risultano potenziate nella loro capacità clonogenica in presenza delle stesse dosi di ATP che inibiscono le cellule leucemiche; dimostrando una risposta alla stimolazione opposta. Quello che osserviamo per l'ATP non avviene in presenza di UTP, il quale non sembra modulare in maniera significativa le cellule leucemiche (figura 5B).

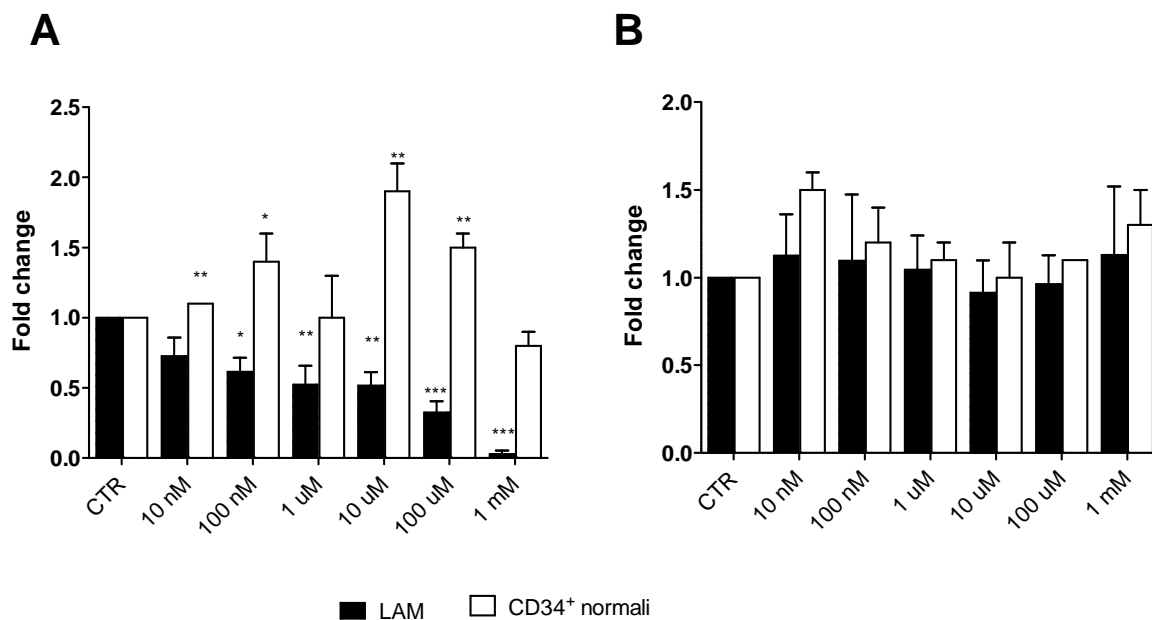


Figura 5. L'ATP inibisce la capacità clonogenica delle cellule leucemiche. Cellule leucemiche isolate da 15 pazienti con LAM e progenitori CD34⁺ ottenuti da 7 donatori sani sono state coltivate in metilcellulosa in presenza di fattori di crescita e dosi crescenti di ATP (A) o UTP (B). Il fold-change è stato calcolato ponendo uguale a 1 il controllo non trattato. *p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001

Oltre alla capacità clonogenica abbiamo valutato anche la proliferazione cellulare mediante coltura liquida in presenza di citochine e nucleotidi. La proliferazione è stata analizzata, secondo la metodica descritta precedentemente, in 7 campioni di AML e in 4 campioni di CD34⁺ normali. I dati più significativi sono stati ottenuti utilizzando il nucleotide ATP. Come mostrato nella figura 6, l'ATP inibisce in maniera significativa la proliferazione cellulare sia delle linee cellulari U937 e OCI-AML3 (figura 6A) che delle cellule primarie (figura 6B). Nelle cellule primarie si osserva una inibizione pari al 40±10% rispetto al controllo non trattato ($p < 0.05$). Al contrario, le cellule CD34⁺ normali risultano stimulate. Per dimostrare che l'effetto inibitorio osservato fosse effettivamente dato dall'ATP, abbiamo aggiunto al terreno di coltura l'apirasi, un enzima che idrolizza l'ATP. Come dimostrato nella figura 6B, l'aggiunta di apirasi riporta la proliferazione cellulare a livelli paragonabili al controllo, inoltre l'utilizzo dell'enzima denaturato ripristina l'inibizione, a dimostrazione del fatto che gli effetti osservati sono dovuti alla presenza di ATP.

Per capire se l'inibizione osservata fosse indotta da un effetto tossico dell'ATP, abbiamo analizzato l'induzione di apoptosi nelle cellule trattate. A tale scopo, dopo 48h di trattamento con ATP, 7 campioni di LAM e 4 campioni normali sono stati analizzati per la positività all'Annexina V (vedi Materiali e Metodi). Come mostrato nella figura 6C, alla massima dose utilizzata per i saggi clonogenici e per la proliferazione, soltanto 2 campioni di LAM su 7 hanno

mostrato un aumento dell'apoptosi. Tuttavia a dosi superiori, l'incremento di cellule apoptotiche diventa significativo in tutti i campioni testati, passando da un 15.4 ± 7 % nel controllo a 34.6 ± 19.4 % nel trattato ($p < 0.05$). Differenze significative tra controlli e trattati non sono state riscontrate nei campioni di CD34⁺ normali.

Non avendo osservato una tossicità significativa alle dosi utilizzate per i saggi clonogenici e la proliferazione, siamo andati ad analizzare la distribuzione del ciclo cellulare per valutare se l'inibizione osservata fosse dovuta ad un blocco del ciclo cellulare. Analizzando la distribuzione del ciclo cellulare delle cellule leucemiche trattate per 48h con 1mM ATP dopo un priming di 24 ore con citochine, abbiamo osservato un significativo aumento della percentuale di cellule in fase G0 del ciclo cellulare rispetto al controllo non trattato (ATP: $42 \pm 18\%$, controllo: $24 \pm 14\%$; $p < 0.05$). Abbiamo, inoltre, evidenziato una diminuzione della fase S del ciclo, anche se, data la variabilità dei campioni, il dato non risulta significativo (Figura 6D pannello i). Al contrario, non abbiamo riscontrato significative modulazioni della distribuzione del ciclo cellulare delle cellule CD34⁺ post trattamento (figura 6D pannello ii).

Nel complesso questi risultati dimostrano che a basse dosi di stimolazione l'ATP induce un blocco della capacità clonogenica e della capacità proliferativa dei blasti leucemici, prevalentemente bloccando la proliferazione del ciclo cellulare.

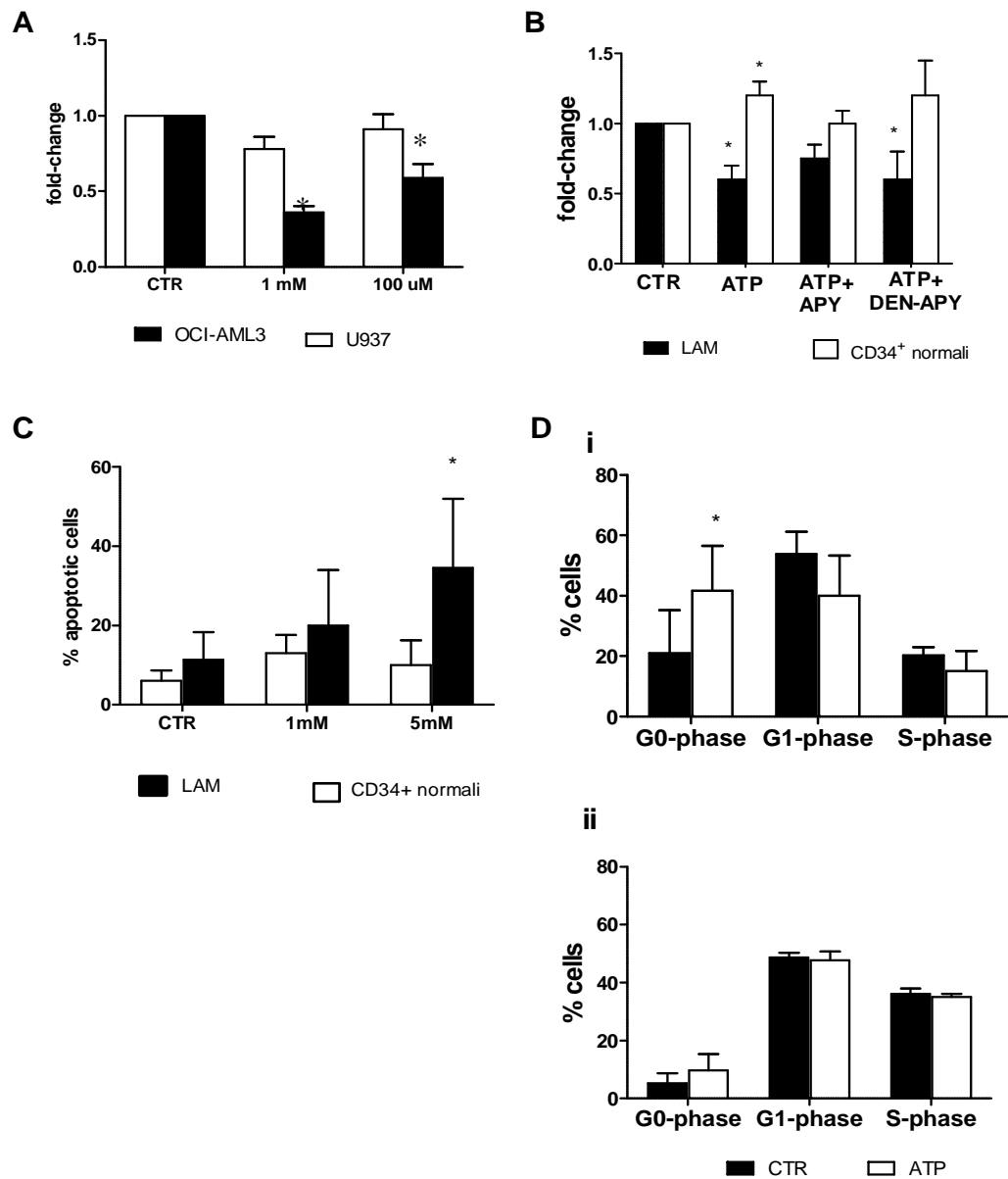


Figura 6. L'ATP inibisce la clonogenicità e la proliferazione delle cellule leucemiche. La proliferazione cellulare è stata valutata mediante CellTiter 96 Acqueous One Solution come descritto. A) Proliferazione delle linee OCI-AML3 e U937 B) Cellule leucemiche e cellule normali sono state stimulate con un cocktail citochinico per 24h e poi trattate con ATP per 48h. La percentuale di cellule proliferanti nel controllo è pari a $60 \pm 23\%$. C) Valutazione della percentuale di cellule apoptotiche in base alla positività per l'Annexina V. D) Distribuzione del ciclo cellulare in cellule leucemiche (pannello i) e in cellule normali CD34⁺ (pannello ii) dopo trattamento con 1mM ATP

5. *L'ATP esplica la sua funzione anti-proliferativa e pro-apoptotica attivando il recettore P2X7.*

Tra i recettori P2, è stato dimostrato che il recettore P2X7 svolge un ruolo importante nella crescita tumorale. La stimolazione del recettore P2X7 attiva segnali che promuovono la proliferazione cellulare e l'over espressione del recettore da parte di cellule tumorali porta un vantaggio proliferativo alla cellula stessa [73] [74] [75] [76] [77].

Basandoci su questi presupposti, ci siamo chiesti se l'inibizione della proliferazione da parte dell'ATP sulle cellule leucemiche fosse mediata dal recettore P2X7.

Per verificare se anche le cellule di LAM mostrassero alti livelli di P2X7R, abbiamo confrontato l'espressione basale del recettore nelle cellule di LAM con l'espressione nei progenitori emopoietici CD34⁺ normali. Come mostrato dalla figura 7A, le cellule leucemiche esprimono livelli superiori di mRNA codificante per il recettore P2X7, rispetto alla controparte normale. Il trattamento con 1mM ATP induce una diminuzione significativa dell'espressione del recettore sia a livello molecolare ($p < 0.05$; figura 7B) che proteico (cellule P2X7⁺ nel controllo: $54 \pm 8\%$, cellule P2X7⁺ nel trattato: $46 \pm 7\%$; $p < 0.01$. Figura 7C). Per dimostrare il coinvolgimento del P2X7R nell'inibizione da parte dell'ATP, abbiamo bloccato il recettore utilizzando un antagonista

specifico, il KN62, prima di valutare l'inibizione della proliferazione cellulare. Come dimostrato dalla figura 7D, il blocco del P2X7R reverta l'effetto inibitorio dell'ATP, dimostrando il coinvolgimento di questo recettore nella regolazione della proliferazione da parte dell'ATP.

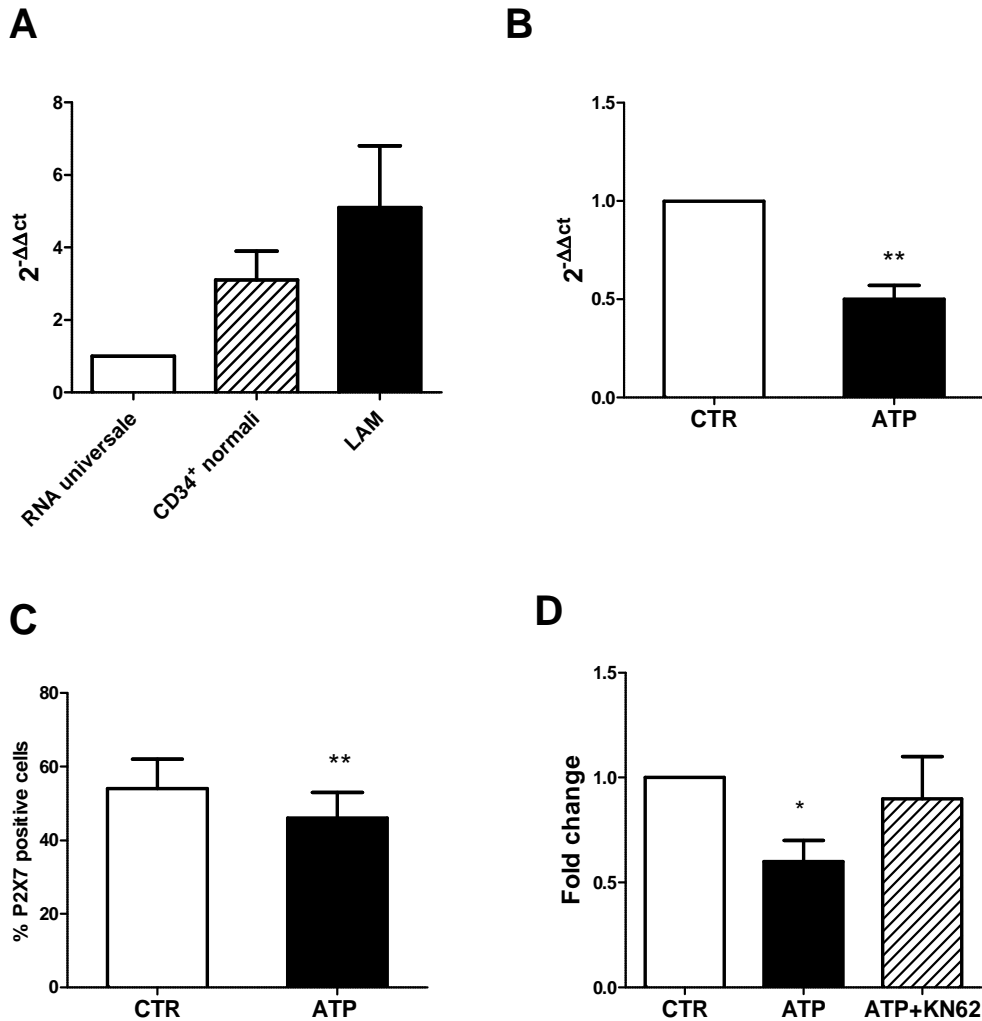


Figura 7. L'ATP inibisce la proliferazione delle LAM agendo sul P2X7R. A) Espressione basale del mRNA per il recettore P2X7 nei progenitori normali e nelle cellule LAM; valutato mediante qRT-PCR. Valutazione degli effetti del trattamento con 1mM ATP sull'espressione del P2X7R, a livello molecolare (B) e proteico (C). Il pre-trattamento con KN62, inibitore specifico del P2X7, annulla l'effetto inibitorio dell'ATP sulla proliferazione delle LAM.

Oltre a regolare processi biologici come la proliferazione, il recettore P2X7 ricopre un ruolo chiave anche nell'attivazione dei processi apoptotici. Quando stimolato in maniera massiva dal ligando ($[ATP] > 2mM$), il recettore rimane permanentemente aperto trasformandosi in un poro canale e attivando la cascata di segnali che inducono alla morte cellulare per apoptosi.

Questo fenomeno si osserva anche nelle cellule di leucemia acuta in seguito a trattamento con ATP. Come precedentemente dimostrato nella figura 6C, il trattamento con dosi elevate di ATP (5mM) induce apoptosi in blasti leucemici; lo stesso effetto non si osserva nelle CD34⁺ normali che sembrano essere meno sensibili. Per dimostrare come la risposta apoptotica delle cellule leucemiche sia correlata con l'espressione del recettore P2X7, abbiamo testato gli effetti di dosi elevate di ATP in due linee cellulari leucemiche con una diversa espressione del recettore. Abbiamo utilizzato la linea HL-60 che esprime bassi livelli di P2X7R (12% cellule P2X7⁺) e la linea OCI-AML3 che è totalmente positiva per l'espressione del recettore (figura 8A). Come evidenziato dalla figura 8B, la percentuale di cellule apoptotiche è superiore nella linea OCI-AML3 che esprime il recettore ad alti livelli. L'elevata espressione del recettore la rende più sensibile all'ATP, anche a dosi inferiori di 2mM.

Nel complesso questi risultati dimostrano come la stimolazione delle cellule leucemiche mediante diverse dosi di ATP, può indurre blocco della proliferazione o apoptosi attraverso l'attivazione del recettore P2X7.

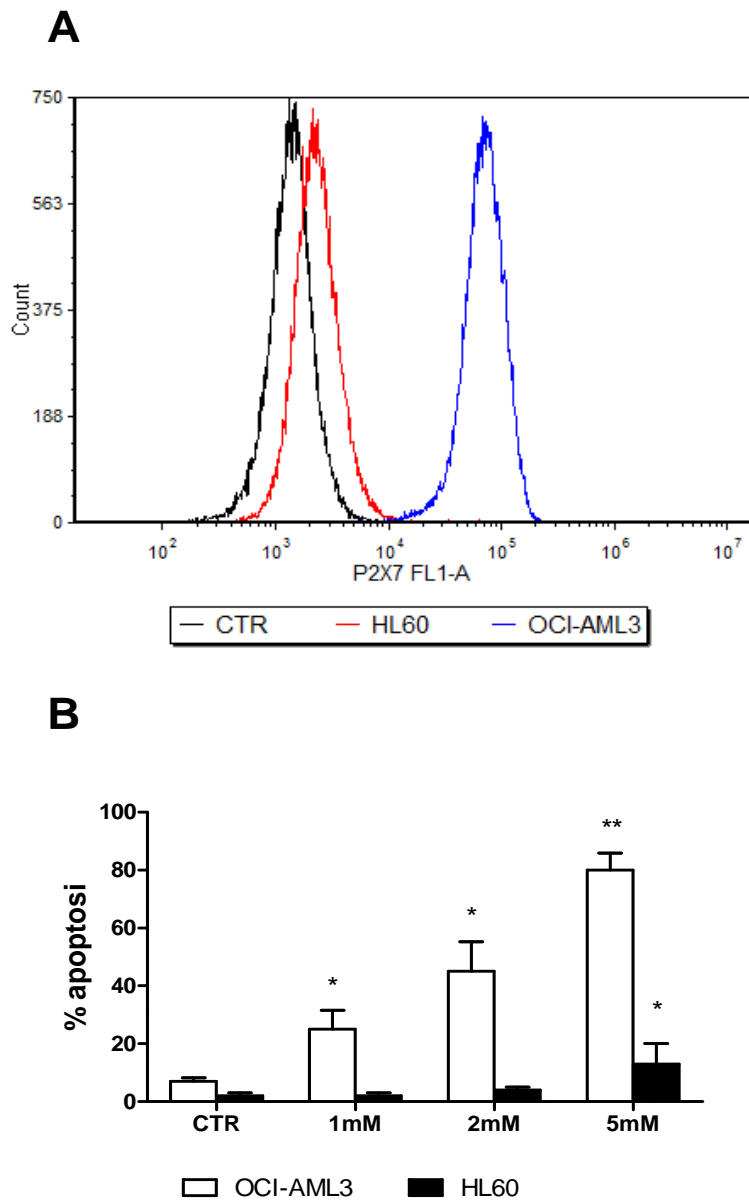


Figura 8. L'ATP induce apoptosi mediante P2X7R A) Valutazione dell'espressione del recettore P2X7 mediante citofluorimetria, nelle linee cellulari HL60 e OCI-AML3. B) Valutazione dell'induzione di apoptosi mediante marcatura con Annessina V, in cellule trattate con varie dosi di ATP per 48h. * $p < 0.05$ e $p < 0.01$ rispetto al controllo non trattato)

6. Effetto inibitorio dei nucleotidi trifosfato sulla migrazione *in vitro* di cellule di LAM

In un precedente studio [78], abbiamo dimostrato come l'UTP sia un fattore stimolante la migrazione *in vitro* ed *in vivo* delle cellule staminali emopoietiche CD34⁺.

Poiché gli studi sul profilo trascrizionale delle cellule esposte a nucleotidi mostravano una generale inibizione dei geni coinvolti nei processi di migrazione, siamo andati a valutare a livello funzionale l'effetto di ATP e UTP sulla capacità migratoria *in vitro* delle cellule leucemiche.

Abbiamo incubato per 24h con 1mM ATP o UTP la linea cellulare U937 e cellule primarie derivate da 5 pazienti di LAM e successivamente abbiamo valutato la loro capacità di migrazione spontanea o verso un gradiente di CXCL-12, mediante transwell. Il pre-trattamento della linea U937 (figura 9A-B) e delle cellule primarie (figura 9C-D) con UTP inibisce la migrazione spontanea e verso un gradiente di CXCL-12 (0.5 ± 0.1 fold-change $p < 0.01$ nelle LAM).

Alla luce del ruolo chiave svolto dall'interazione tra CXCL12 ed il suo recettore CXCR4 nel modulare la migrazione, ci siamo chiesti se l'effetto inibitorio dell'UTP potesse essere imputabile ad una modulazione del livello di espressione di CXCR4 da parte delle cellule leucemiche.

A questo scopo, cellule leucemiche sono state incubate in presenza o assenza di UTP (1mM) per 24h. L'analisi citofluorimetrica di CXCR4 non ha tuttavia mostrato alcuna differenza significativa nei livelli di espressione di CXCR4 nelle cellule trattate rispetto ai controlli non trattati (dati non mostrati).

Anche l'ATP ha mostrato un significativo effetto inibitorio sulla migrazione: la linea U937 viene inibita sia nella sua capacità di migrazione spontanea che verso un gradiente chemochinico; mentre le cellule primarie sono risultate essere inibite soltanto nella loro capacità di migrare spontaneamente (0.7 ± 0.2 fold-change, $p < 0.05$).

I recettori P2Y, ampiamente espressi dalle cellule di leucemia acuta mieloide, mediano l'attivazione di segnali che regolano la motilità cellulare [79] [80]. Poiché l'UTP è il ligando ad alta affinità per i recettori P2Y2, P2Y4 e P2Y6, abbiamo ipotizzato che l'inibizione della migrazione indotta da UTP fosse mediata dall'attivazione di questi recettori. Abbiamo quindi valutato la capacità migratoria delle cellule leucemiche dopo trattamento con specifici agonisti per questi recettori: INS415, agonista del P2Y2R e P2Y6R e INS45973, agonista del P2Y2R e P2Y4R. Come mostrato nella figura 9C-D, l'agonista INS45973 esplica una forte azione inibitoria sulle cellule leucemiche, sia da solo che in presenza della chemochina CXCL12, a livelli paragonabili all'UTP. L'agonista INS415 risulta inibire soltanto la migrazione spontanea, così come l'ATP. Questi risultati nel complesso dimostrano che il legame selettivo di ATP e UTP ai recettori P2Y può essere il meccanismo principale attraverso il quale i nucleotidi

modulano la migrazione cellulare; in particolare sembra che l'UTP regoli la migrazione verso un gradiente di CXCL-12 legandosi al recettore P2Y4.

La capacità di una cellula di migrare direzionalmente è stata positivamente correlata, oltre che alla sua motilità intrinseca, anche alla capacità di aderire con i substrati circostanti. In particolare, una delle interazioni adesive importanti per le cellule staminali emopoietiche è quella tra integrine e filamenti di fibronectina. Ci siamo quindi chiesti se l'inibizione della motilità cellulare delle cellule leucemiche, osservata dopo trattamento con nucleotidi, fosse dovuta ad una modulazione della capacità di adesione e ad una modulazione dell'espressione di integrine, come il CD49e e il CD49d. Né la capacità di aderire a piastre coattate con fibronectina né il fenotipo delle integrine sono risultati alterati in seguito all'esposizione con ATP o UTP (dati non mostrati).

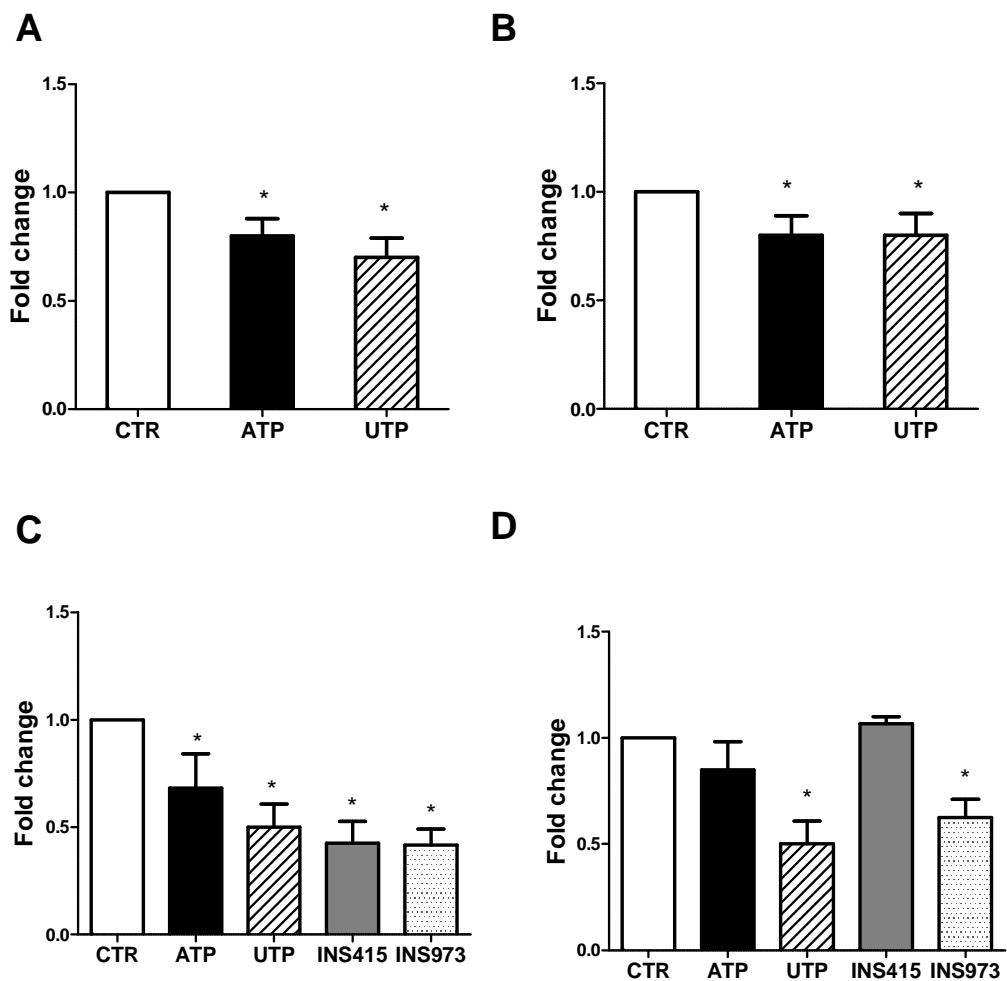


Figure 9. L'UTP inibisce la migrazione di cellule leucemiche attraverso specifici recettori P2Y. La linea cellulare U937(A,B) e cellule leucemiche di LAM sono state pre-incubate per 24h con ATP, UTP, INS415(agonista di P2Y2/P2Y4R) e INS45937(agonista di P2Y2/P2Y6R). La migrazione è stata valutata mediante l'utilizzo di pozzetti transwell e le cellule non trattate sono state utilizzate come controllo. C) migrazione spontanea di cellule di LAM, la percentuale di cellule migranti nel controllo è pari a $15\pm 4\%$. D) migrazione di cellule leucemiche verso CXCL12, la percentuale di cellule migranti nel controllo è pari a $22\pm 5\%$. $P < 0.05$

7. I nucleotidi trifosfato inibiscono la capacità di homing ed engraftment delle cellule di LAM in topi immunocompromessi

Al fine di valutare gli effetti dei nucleotidi trifosfato sulla migrazione *in vivo* sono stati eseguiti saggi di homing in modelli murini di xenotrapianto.

A tale scopo, cellule leucemiche sono state incubate per 24h in presenza di ATP, UTP o dei loro analoghi stabili e successivamente inoculate in topi NSG irradiati subletalmente. Ventiquattro ore dopo l'inoculo, è stata quindi valutata la percentuale di cellule umane presenti nel midollo del topo ricevente. Il pretrattamento con nucleotidi ha dimostrato inibire la capacità di *homing* delle cellule leucemiche. In particolare, come mostrato nella figura 10A, l'ATP riduce del 44% la quantità di cellule hCD45⁺ presenti nel sangue midollare, la riduzione raggiunge il 72% ($p < 0.05$) in caso di trattamento con UTP. Anche l'incubazione con gli analoghi ha mostrato un'effetto inibitorio (INS415 43%, INS45937 78%, $p < 0.05$), dimostrando il coinvolgimento dei recettori P2Y2, P2Y4 e P2Y6 nella regolazione dei processi di migrazione anche *in vivo*. Nel complesso, questi dati risultano molto interessanti, soprattutto alla luce dei dati ottenuti *in vivo* con le CD34⁺ normali [78].

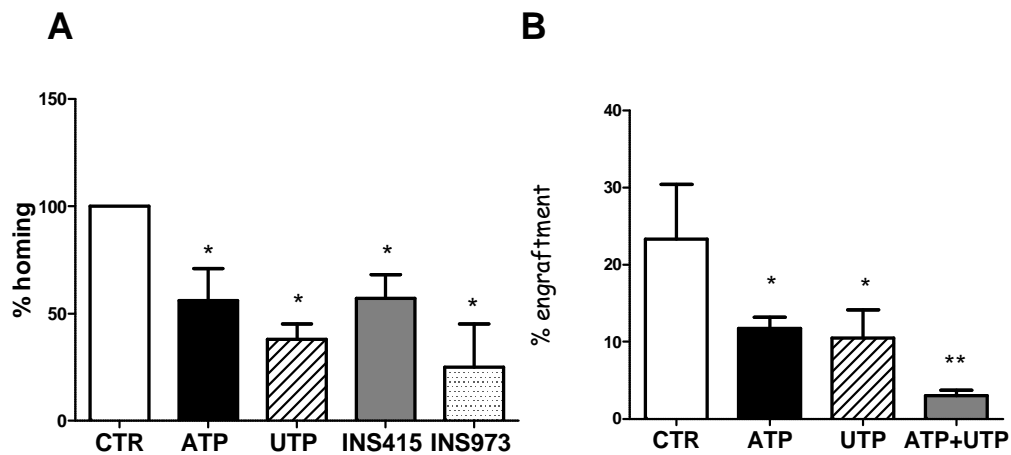


Figura 10. I nucleotidi extracellulari inibiscono l'homing (A) e l'engraftment (B) di cellule leucemiche in topi immunocompromessi.

Successivamente abbiamo valutato gli effetti del trattamento con ATP e UTP sulla capacità di engraftment a lungo termine di cellule leucemiche trapiantate in topi immunocompromessi. Anche in questo caso sia l'ATP (inibizione media 53%) che l'UTP (inibizione media 51%) hanno mostrato un forte effetto inibitorio sull'attecchimento delle cellule umane nel topo ricevente (figura 10B, $p < 0.05$). Le percentuali di attecchimento nelle varie condizioni sono state: controllo non trattato $23.3 \pm 7.1\%$; ATP $11.7 \pm 1.5\%$; UTP $10.5 \pm 3.6\%$. La combinazione dei due nucleotidi ha mostrato un'inibizione ulteriore rispetto ai singoli trattamenti, dimostrando un effetto sinergico tra i due e supportando l'idea che ATP e UTP abbiano meccanismi di azione diversi nell'indurre inibizione dell'engraftment.

A questo punto ci siamo chiesti se gli effetti dei nucleotidi osservati sulle cellule leucemiche in toto si esplicassero anche sul compartimento delle cellule

staminali leucemiche. A questo scopo, cellule CD38⁻CD34⁺ sono state purificate mediante *cell sorting* dal sangue periferico di 5 pazienti con LAM. Per valutare se la popolazione purificata fosse effettivamente composta da cellule staminali leucemiche e non fosse contaminata da cellule normali, abbiamo confermato, mediante analisi molecolare, la presenza delle stesse alterazioni presenti nella popolazione di blasti in toto, dimostrandone l'origine leucemica (vedi figura 11A). Tale analisi è stata gentilmente svolta dal Laboratorio di Diagnostica Molecolare del nostro Istituto. Le cellule ottenute sono state incubate con nucleotidi nelle stesse condizioni dei blasti in toto e successivamente inoculate in topi immunocompromessi. Come dimostrato nella figura 11B, il trattamento con ATP e UTP ha indotto una significativa diminuzione dell'engraftment a lungo termine dell'emopoiesi leucemica, nelle stesse condizioni sperimentali dei blasti leucemici. È stato interessante notare che anche gli analoghi INS415 e INS45973 hanno dato gli stessi risultati, dimostrando che il signaling purinergico viene attivato anche al livello del compartimento staminale leucemico.

Nel complesso questi dati confermano a livello funzionale le modulazioni osservate a livello molecolare dall'analisi dei microarrays.

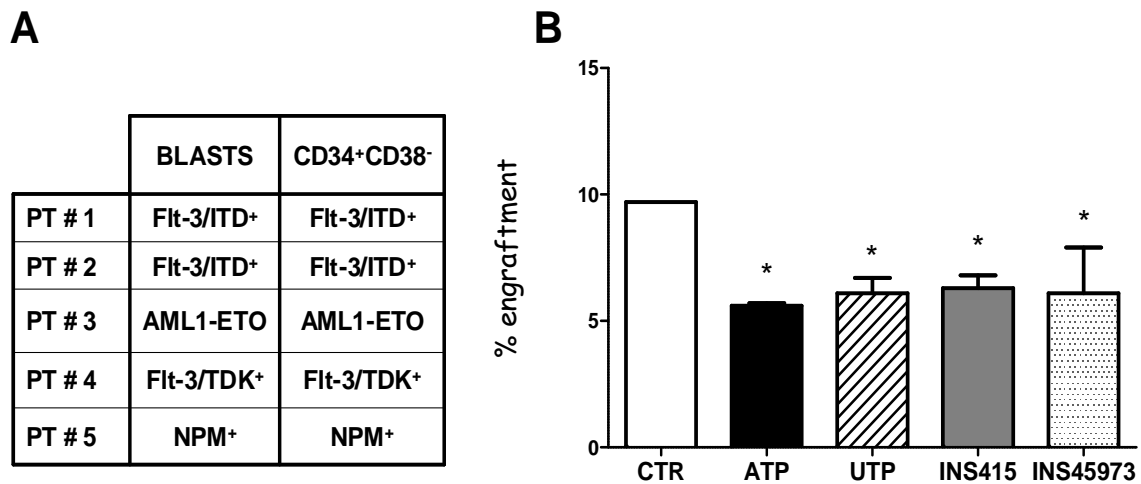


Figura 11. I nucleotidi trifosfato inibiscono l'attecchimento di cellule staminali leucemiche.

(A) Caratterizzazione molecolare delle cellule staminali leucemiche CD38⁻CD34⁺ (B) Attecchimento *in vivo*, di cellule staminali leucemiche trattate *ex-vivo* con ATP, UTP, e con gli analoghi INS415 e INS45973

8. Utilizzo farmacologico dell'ATP *in vivo*

L'osservazione che i nucleotidi trifosfato, in particolare l'ATP, bloccano la crescita cellulare leucemica *in vitro* e *in vivo*, esercitando effetti opposti sui progenitori emopoietici, ci ha portato ad ipotizzare un potenziale utilizzo terapeutico dell'ATP per il trattamento della LAM.

Abbiamo quindi testato l'effetto farmacologico dell'ATP in un modello murino di leucemia umana.

Per verificare che la somministrazione di ATP non fosse tossica di per sé, abbiamo eseguito test preliminari di tossicità, somministrando quotidianamente

a topi NSG 100mM ATP per 15 giorni attraverso iniezioni intraperitoneali. Il quindicesimo giorno i topi sono stati sacrificati ed è stato eseguito un emocromo dal sangue periferico. I valori dell'emocromo sono risultati nella norma sia nei topi trattati che in quelli di controllo ($1.3-1.8 \times 10^3 / \mu\text{l}$ WBC), denotando la non tossicità del trattamento (dati non mostrati).

Abbiamo quindi indotto una leucemia umana inoculando cellule leucemiche primarie in topi precedentemente irradiati e abbiamo applicato lo schema di trattamento descritto nella sezione Materiali e Metodi. Come mostrato dalla figura 12A, il trattamento con ATP diminuisce la percentuale di cellule hCD45 positive nel sangue periferico, denotando un effetto inibitorio sull'attecchimento delle cellule umane. La diminuzione si osserva già all'ottava settimana dal trapianto anche se i valori di engraftment sono ancora bassi, alla sedicesima settimana si raggiunge l'80% di inibizione con attecchimenti pari a $17,9 \pm 1,9\%$ nei topi controllo rispetto a $4,3 \pm 1,3\%$ nei topi trattati ($p < 0.05$).

A questo punto ci siamo chiesti se lo stesso effetto inibitorio osservato trattando i topi contemporaneamente al trapianto, si mantenesse anche sulla crescita tumorale di una leucemia già conclamata. Abbiamo quindi ripetuto lo stesso esperimento trattando i topi ad attecchimento avvenuto. Al momento della stesura di questa tesi, l'esperimento non è ancora concluso. Dati preliminari dimostrano che l'effetto inibitorio del trattamento con ATP viene mantenuto almeno fino all'ottava settimana (dati non mostrati).

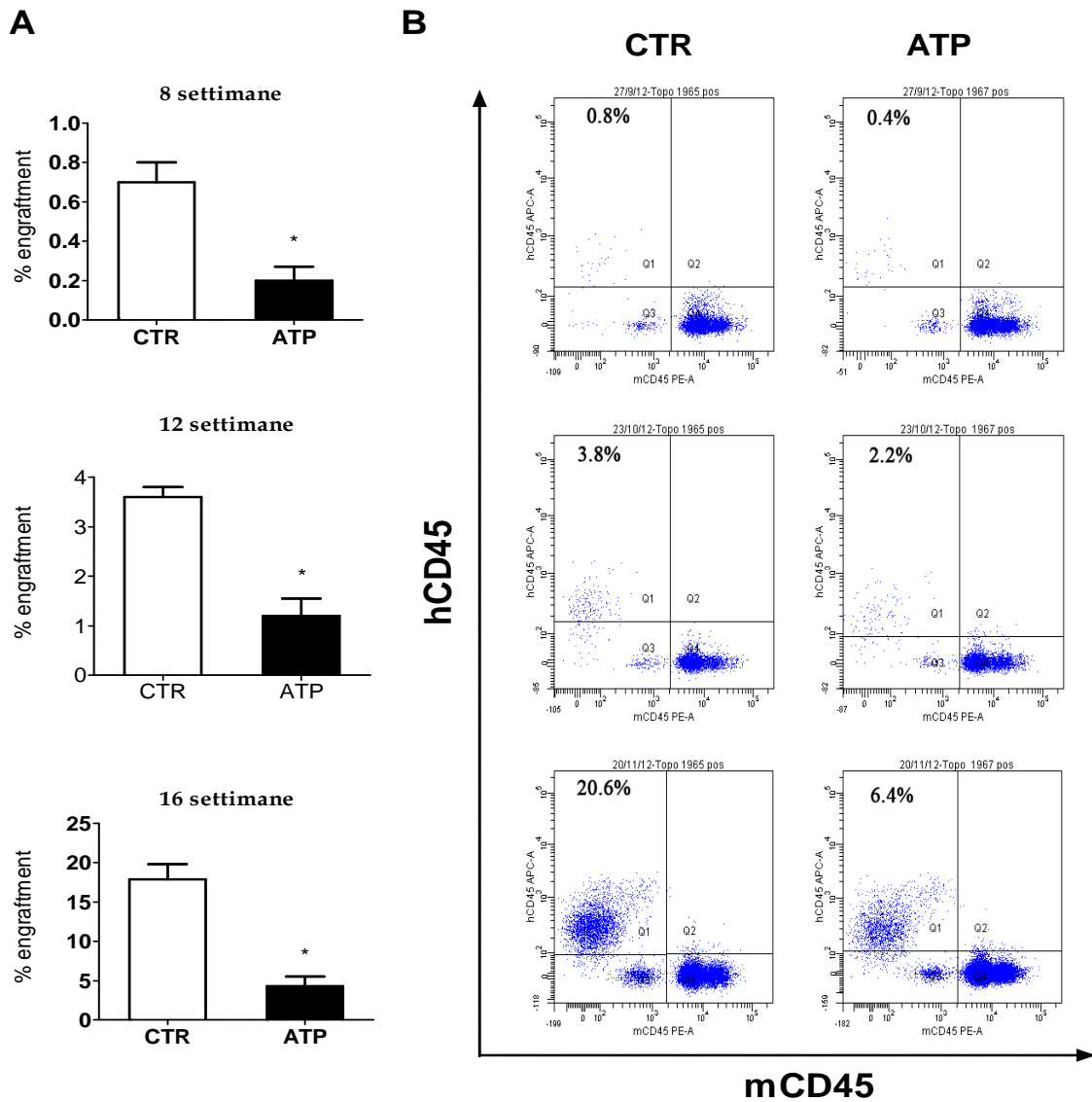


Figura 12. L'ATP inibisce la crescita leucemica *in vivo*. Topi NSG immunodepressi sono stati inoculati con cellule leucemiche e trattati a giorni alterni con 100mM ATP per via intraperitoneale. A) Attecchimenti a lungo termine di topi trattati vs topi di controllo. B) Analisi rappresentativa degli attecchimenti di due topi, un trattato ed un controllo, a 8, 12 e 16 settimane dal trapianto. *P<0.05

Discussione

Le cellule staminali emopoietiche risiedono nel midollo osseo, all'interno di un ambiente (chiamato "nicchia staminale") che le protegge dagli insulti esterni e mantiene la loro capacità di produrre cellule del sangue per tutta la vita di un individuo. Studi recenti sembrano tuttavia suggerire che la nicchia non sia così isolata come inizialmente postulato: citochine infiammatorie e altri segnali di pericolo possano penetrare all'interno del midollo osseo e influenzare l'attività di cellule staminali e progenitori emopoietici. Il nostro Laboratorio è impegnato già da diversi anni in questo filone di ricerca e si è focalizzato, in particolare, nello studio molecole coinvolte nel network di segnali infiammatori all'interno del midollo osseo: i nucleotidi extracellulari. I nucleotidi extracellulari sono importanti mediatori delle funzioni cellulari, numerosi studi hanno evidenziato come in base alla loro presenza nel milieu extracellulare queste molecole sono in grado di modulare importanti funzioni come la proliferazione, l'apoptosi o la migrazione. Abbiamo dimostrato che l'adenosina trifosfato (ATP) presente nel microambiente midollare ha una spiccata azione stimolatoria sulle cellule staminali emopoietiche, promuovendone la crescita e la proliferazione [81] mentre l'UTP ne regola positivamente la migrazione sia *in vitro* che *in vivo* [78]. Contemporaneamente ai nostri studi, vari gruppi di ricerca hanno dimostrato l'effetto antineoplastico dell'ATP sulla crescita di numerosi tumori solidi. Basandoci su tali presupposti, ci siamo chiesti quale potesse essere l'effetto dell'attivazione del signaling purinergico da parte dei nucleotidi trifosfato sul

compartimento staminale leucemico di una neoplasia ematologica, come la LAM.

Nel presente studio abbiamo quindi investigato se e a che livello, i recettori P2 e i loro ligandi sono coinvolti nella regolazione delle cellule leucemiche.

Abbiamo inizialmente dimostrato che i blasti leucemici di AML esprimono i vari sottotipi recettoriali P2. Anche se diversi campioni hanno mostrato una diversa risposta alla stimolazione con ATP e UTP (riflettendo l'intrinseca eterogeneità all'interno delle varie tipologie di LAM), tutti i campioni testati sono risultati essere responsivi in termini di attivazione del signaling purinergico, come dimostrato dalla mobilitazione del calcio intracellulare. Più a valle nella cascata di segnale, l'analisi del GEP ha dimostrato come l'esposizione ad ATP inducesse nei blasti leucemici, ma non nelle cellule staminali normali, l'espressione di geni coinvolti nell'inibizione del ciclo cellulare e modulatori negativi della motilità cellulare, come gli inibitori delle GTPasi. Al contrario, ha mostrato inibire geni promuoventi la progressione del ciclo cellulare, gli attivatori della migrazione e le molecole di adesione coinvolte nell' homing e nell'engraftment *in vivo*. A livello funzionale, in contrasto con quanto dimostrato sulle cellule staminali normali in questo e nei precedenti studi [81], [78] ma in maniera consistente con i risultati di GEP, la stimolazione da parte dell' ATP extracellulare ha prodotto sulle cellule leucemiche una significativa inibizione della crescita e della capacità clonogenica.

Studi presenti in letteratura hanno dimostrato che l'ATP extracellulare è in grado di indurre apoptosi in numerosi tipi cellulari [82]. I nostri dati dimostrano che nelle LAM, basse dosi di ATP inducono un blocco del ciclo cellulare inducendo un accumulo di cellule nella fase G0 del ciclo, probabilmente responsabile della diminuzione di proliferazione osservata. L'apoptosi viene indotta soltanto nel 28% dei campioni anche se l'*up-regolazione* dei geni pro-apoptotici a livello trascrizionale è piuttosto evidente in tutti i campioni trattati. L'induzione di apoptosi diventa significativa in tutti i campioni aumentando le concentrazioni di trattamento, raggiungendo dosi di 5mM. E' interessante notare come i blasti di LAM risultino essere sensibili all'effetto inibitorio dell'ATP mentre non rispondono al nucleotide UTP in termini di modulazione della crescita clonogenica o della proliferazione *in vitro*. E' stato dimostrato che la stimolazione del recettore P2X7 da parte dell'ATP supporta la proliferazione in vari modelli cellulari, inclusi i linfociti T, le HEK293 e in numerose cellule tumorali. In particolare, le cellule neoplastiche sembrano acquisire un vantaggio proliferativo dall'over espressione del recettore P2X7 [73] [74] [83] [76] [77]. Il meccanismo attraverso il quale il recettore P2X7 influenza la proliferazione cellulare non è ancora stato chiarito, anche se la sua attivazione da parte del ligando è stato dimostrato aumentare la concentrazione citosolica e mitocondriale di calcio, portando così ad un incrementata produzione di ATP da parte degli organelli.

Recentemente, il gruppo di Zhang ha dimostrato che l'espressione del recettore P2X7 risulta essere aumentata nei campioni di LAM rispetto ai controlli normali [84]. Inoltre ha mostrato come l'indice di remissione dei pazienti che esprimono il recettore ad alti livelli è notevolmente più basso se confrontato sia con i pazienti che non lo esprimono che con quelli che mostrano bassi livelli.

Chong e colleghi hanno dimostrato che la cooperazione tra specifici sottotipi recettoriali P2X può contribuire allo sviluppo neoplastico nelle leucemie pediatriche [85].

E' stato chiaramente dimostrato come un' alta espressione del recettore P2X7 sia stata riscontrata nei pazienti che sono andati in contro a ricaduta. Inoltre pazienti che inizialmente esprimevano bassi livelli di recettore ma poi sono ricaduti, al momento della ricaduta mostravano un over-espressione del P2X7R rispetto alla diagnosi, suggerendo un ruolo di questo recettore nella progressione della malattia.

Nel complesso i nostri risultati confermano l'aumentata espressione del recettore P2X7 nei campioni di LAM e dimostrano come la sua attivazione regoli i processi proliferativi. Inoltre abbiamo dimostrato che l'ATP esplica il suo ruolo anti-proliferativo sulle cellule leucemiche riducendo l'over-espressione del recettore P2X7, interferendo così con le sue funzioni pro-proliferative. Il ruolo cruciale del P2X7R nell'inibizione della crescita ATP mediata può spiegare la completa mancanza di effetti sulla crescita e

proliferazione cellulare da parte dell'UTP, il quale non è in grado di legarsi a questo recettore.

Vari studi hanno dimostrato la capacità dell'ATP di sopprimere la crescita, *in vitro* e *in vivo*, di svariate cellule tumorali derivate da varie neoplasie o in linee cellulari: ad esempio cellule del tumore della prostata, cellule di adenocarcinoma del colon e del pancreas, cellule di melanoma e del cancro alla vescica [63] [62] [86] [87] [64]. Oltre ad agire su cellule derivate da tumori solidi, l'ATP sopprime la proliferazione e stimola il differenziamento in cellule di neoplasie ematologiche, come la linea di leucemia acuta promielocitica HL60 [88]. Negli anni sono state proposte numerose applicazioni cliniche per l'ATP o per il derivato del suo metabolismo, l'adenosina, soprattutto in campo oncologico [89] [90] [91] [92] [93] e numerosi sono i meccanismi descritti come responsabili dell'effetto antineoplastico dell'ATP sulle cellule tumorali [48] [94] [95] [96].

In questo studio abbiamo dimostrato che la dose di 1mM ATP diminuisce la proliferazione leucemica ma, per apprezzare gli effetti citotossici del trattamento e quindi indurre apoptosi, dobbiamo raggiungere dosi più alte di trattamento (5mM ATP). Questo fatto è spiegabile con una peculiarità del recettore P2X7 [82]: a basse dosi di stimolazione questo recettore è un canale di membrana che si apre in maniera transiente in seguito al legame con il ligando. Quando la stimolazione diventa massiva, il recettore si trasforma in un poro permanentemente aperto che attiva la cascata di segnali citotossici che portano

ad apoptosi e morte cellulare. Questo spiega anche il fatto che cellule leucemiche esprimenti alti livelli di P2X7R sono più responsive ad alte dosi ATP in termini di induzione di apoptosi, rispetto alle cellule P2X7^{low}.

A dimostrazione dell'importanza di questo recettore nello sviluppo neoplastico delle malattie ematologiche, così come nelle LAM, anche nella Leucemia Linfoblastica Cronica (B-CLL) è stato dimostrato che l'over espressione del recettore P2X7 in cellule di B-CLL correla con una maggiore aggressività della malattia e con la diminuzione della sopravvivenza [73]. In questo studio abbiamo dimostrato che l'ATP oltre ad indurre effetti pro-apoptotici e anti-proliferativi tramite attivazione del recettore, può anche attivare una cascata di segnali che mediante feedback negativo regolano l'espressione del recettore stesso interferendo con i vantaggi proliferativi offerti dall'over espressione. Infatti l'esposizione di cellule LAM ad ATP induce una diminuzione dell'espressione del P2X7R sia a livello di mRNA che a livello proteico.

Una importante caratteristica delle cellule staminali emopoietiche ma anche delle cellule leucemiche è la loro capacità migratoria. Le cellule staminali emopoietiche migrano dal midollo verso il sangue periferico al fine di mantenere l'omeostasi del sistema emopoietico. Il fenomeno complementare alla migrazione è l'homing, ossia l'insieme dei fenomeni che portano un progenitore emopoietico a migrare dalla periferia verso il midollo. In questo studio abbiamo analizzato come i processi di migrazione *in vitro*, di homing ed

engraftment *in vivo* delle cellule leucemiche vengono alterati dalla presenza di nucleotidi trifosfato.

Abbiamo osservato che i nucleotidi extracellulari possono inibire la motilità delle cellule di LAM *in vitro*. In particolare è stato dimostrato che l'ATP inibisce la capacità di migrazione spontanea delle cellule leucemiche, mentre l'UTP è in grado di inibire anche la capacità migratoria verso un gradiente chemochinico di CXCL-12. Questa chemochina insieme al suo recettore, il CXCR4, è la principale responsabile del *trafficking* delle cellule staminali emopoietiche da e verso il midollo. Utilizzando specifici inibitori, abbiamo osservato che i recettori P2 prevalentemente coinvolti nella regolazione della motilità delle cellule leucemiche sono i recettori P2Y2 e P2Y4. Anche la capacità di homing ed engraftment *in vivo* sono risultate fortemente inibite dal trattamento delle cellule leucemiche con nucleotidi, prima del trapianto. Ma l'aspetto ancor più interessante è che queste molecole risultano agire non solo a livello dei blasti leucemici ma anche a livello delle compartimento staminale leucemico, indicando che il signaling purinergico è attivo anche sulle staminali leucemiche CD38-CD34⁺. I meccanismi che regolano la diminuzione dell'engraftment dopo trattamento *ex-vivo* devono ancora essere approfonditi, sicuramente l'osservata diminuzione dell'homing midollare delle cellule trattate potrebbe esserne una causa.

Analizzando nel complesso i dati ottenuti, abbiamo osservato un generale effetto inibitorio dei nucleotidi sulla funzionalità delle cellule leucemiche;

effetto tra l'altro opposto a quello osservato nei progenitori emopoietici normali. In particolare il forte effetto antineoplastico dell'ATP, già documentato per altri tumori e da noi confermato nella LAM, ci ha portato ad ipotizzare un utilizzo terapeutico per il trattamento della LAM. Al momento non risultano pubblicati in letteratura protocolli clinici che prevedano l'utilizzo di ATP per il trattamento di neoplasie; ma nell'uomo è già utilizzato in pazienti affetti da tumore al polmone per contrastare la perdita di peso nello stadio avanzato della malattia e in pazienti con disfunzioni del microcircolo coronarico [97] [98]. Al fine di validare la nostra ipotesi, abbiamo sviluppato un protocollo di trattamento *in vivo* in un modello murino di leucemia umana. Dati preliminari, mostrano come la somministrazione di ATP per via intraperitoneale rallenti la crescita e lo sviluppo della leucemia nel topo. Questi risultati dovranno essere confermati ed approfonditi, ma nel complesso dimostrano che l'utilizzo di nucleotidi trifosfato può essere un buon punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per la leucemia mieloide acuta.

Bibliografia

- [1] S. Tura, *Malattie del sangue e degli organi emopoietici*, Casa editrice Esculapio.
- [2] J. Wang, «Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow mobilized peripheral blood as measured by quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay,» *Blood*, n. 89, pp. 3919-3924, 1997.
- [3] F. Notta, «Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment,» *Science*, n. 333, pp. 218-221, 2011.
- [4] E. Zanjani, «Transplantation of hematopoietic stem cells in utero,» *Stem Cells*, n. 15, pp. 79-72, 1997.
- [5] T. Sato, «Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells,» *Blood*, n. 94, pp. 2548-2554, 1999.
- [6] M. Dao, «Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution,» *Blood*, n. 101, pp. 112-118, 2003.
- [7] E. Zanjani, «Reversible expression of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cell,» *Exp Hematol*, n. 31, pp. 406-412, 2003.
- [8] R. Schoefield, «The relationship between the spleen colony forming cell and the haemopoietic stem cell,» *Blood*, Vol. 1 di 2(1-2), n. 4, pp. 7-25, 1978.
- [9] I. Gong, «Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells,» *Science*, vol. 4336, n. 199, pp. 1443-1445, 1978.
- [10] B. Lord, «The relative spatial distribution of CFU and CFUc in the normal mouse femur,» *Blood*, vol. 1, n. 46, pp. 65-72, 1975.
- [11] L. Clavi, «Cellular complexity of the bone marrow hematopoietic stem cell niche,» *Calcif Tissue Int*, n. Epub ahead of print, 2013.
- [12] C. Nombela-Arrieta, «Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment,» *Nat Cell Biol*, vol. 5, n. 15, pp. 533-543, 2013.
- [13] J. Griffin, «Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia,» *Blood*, n. 68, pp. 1185-1195, 1986.
- [14] D. Bonnet, «Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell,» *Nat Med*, n. 3, pp. 730-737, 1997.
- [15] T. Lapidot, «A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice,» *Nature*, n. 367, pp. 645-648, 1994.
- [16] H. Sutherland, «Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells,» *1996*, vol. 11, n. 87, pp. 4754-4761, *Blood*.
- [17] M. AL-HAji, «Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells,» *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 7, n. 100, pp. 3983-3988, 2003.
- [18] S. Singh, «Identification of a cancer stem cell in human brain tumors,» *Cancer Res*, vol. 18, n. 63, pp. 5821-5828, 2003.
- [19] S. Singh, «Identification of human brain tumour initiating cells,» *Nature*, vol. 7015, n. 432, pp. 396-401, 2004.
- [20] D. Grimwade, «Acute promyelocytic leukemia: where does it stem from?,»

- Leukemia*, n. 18, p. 375, 2004.
- [21] K. Hope, «Human acute myeloid leukemia stem cells.,» *Arch Med Res*, n. 34, p. 507, 2003.
- [22] A. Blair, «Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo,» *Blood*, n. 89, p. 3104, 1997.
- [23] C. Jordan, «The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells.,» *Leukemia*, vol. 10, n. 14, pp. 1777-1784, 2000.
- [24] K. Hope, «Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity.,» *Nat Immunol*, vol. 7, n. 5, pp. 738-743, 2004.
- [25] G. Guenechea, «Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential,» *Nat Immunol*, vol. 1, n. 2, pp. 75-82, 2001.
- [26] K. Hope, «Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity,» *Nat Immunol*, n. 7, p. 738, 2004.
- [27] A. Cozzio, «Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors,» *Genes Dev*, vol. 24, n. 17, pp. 3029-3035, 2003.
- [28] F. Ishikawa, «Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region,» *Nat Biotechnol*, n. 25, pp. 1315-1320, 2007.
- [29] S. Iwamoto, «Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase,» *J Clin Invest*, n. 117, pp. 1049-1057, 2007.
- [30] J. Wei, «Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia.,» *Cancer Cell*, n. 13, pp. 483-495, 2008.
- [31] T. Lapidot, «How do stem cells find their way home?,» *Blood*, n. 105, pp. 1901-1910, 2005.
- [32] C. Bleul, «The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV entry,» *Nature*, n. 382, pp. 829-832, 1996.
- [33] A. Peled, «Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4,» *Science*, n. 283, pp. 845-848, 1999.
- [34] A. Spiegel, «Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signalling,» *Blood*, vol. 8, n. 103, pp. 2900-2907, 2004.
- [35] A. Colmone, «Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells.,» *Science*, vol. 5909, n. 322, pp. 1861-1865, 2008.
- [36] V. Ralevic, «Receptors for purines and pyrimidines.,» *Pharmacol Rev*, n. 50, pp. 413-492, 1999.
- [37] Boeynaems, «Overview of the P2 receptors.,» *Semin Thromb Hemost*, vol. 2, n. 31, pp. 139-149, 2005.

- [38] G. Burnstock, «A basis for distinguishing two types of purinergic receptor,» *Cell Membrane receptor for Drugs and Hormones*, pp. 107-118, 1978.
- [39] V. Ralevic, «Receptors for Purines and Pyrimidine,» *Pharmacological Review*, vol. 50, n. 3, pp. 413-492, 1998.
- [40] F. Di Virgilio, «Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells,» *Blood*, n. 97, pp. 587-600, 2001.
- [41] M. Cattaneo, «Antiaggregatory activity in human platelets of potent antagonists of the P2Y₁ receptor,» *Biochem Pharmacol*, vol. 10, n. 68, pp. 1995-2002, 2004.
- [42] M. Hyman, «Self-regulation of inflammatory cell trafficking in mice by the leukocyte surface apyrase CD39,» *J Clin Invest*, vol. 5, n. 119, p. 1136, 2009.
- [43] T. Muller, «The purinergic receptor P2Y₂ receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation,» *Allergy*, vol. 12, n. 65, pp. 1545-1553, 2010.
- [44] C. Pizzirani, «Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 β -loaded microvesicles from human dendritic cells,» *Blood*, vol. 9, n. 109, pp. 3856-3864, 2007.
- [45] S. Trabanelli, «Extracellular ATP exerts opposite effects on activated and regulatory CD4⁺ T cells via purinergic P2 receptor activation,» *J Immunol*, vol. 3, n. 189, pp. 1303-1310, 2012.
- [46] L. Lemoli, «Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo,» *Blood*, n. 104, pp. 1662-1670, 2004.
- [47] L. Rossi, «The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration,» *Blood*, vol. 2, n. 109, pp. 533-542, 2007.
- [48] E. Rapaport, «Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle,» *J Cell Physiol*, vol. 3, n. 114, pp. 279-283, 1983.
- [49] L. Spychala, «Tumor-promoting function of adenosine,» *Pharmacol Ther*, n. 87, pp. 161-173, 2000.
- [50] G. Burnstock, «Purinergic signalling and cancer,» *Purinergic Signalling*, vol. 9, n. 4, pp. 491-540, 2013.
- [51] T. Deli, «Extracellular ATP and cancer: an overview with special reference to P2 purinergic receptors,» *Pathol Oncol Res*, n. 14, pp. 219-231, 2008.
- [52] I. Martins, «Chemotherapy induces ATP release from tumor cells,» *Cell Cycle*, n. 8, pp. 3723-3728, 2009.
- [53] F. Ghiringhelli, «Activation of the NLRP2 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β dependent adaptive immunity against tumors,» *Nat Med*, n. 15, pp. 1170-1178, 2009.
- [54] L. Aymeric, «Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity,» *Cancer Res*, n. 70, pp. 855-858, 2010.
- [55] F. Marteau, «Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells,» *Blood*, n. 106, pp. 3860-

3866, 2005.

- [56] C. Haskell, «Phase I trial of extracellular adenosine 5'-triphosphate in patients with advanced cancer.,» *Med Pediatr Oncol*, n. 27, pp. 165-173, 1996.
- [57] C. Haskell, «Phase II study of intravenous adenosine 5'-triphosphate in patients with previously untreated stage IIIB and stage IV non-small cell lung cancer.,» *Invest New Drugs*, n. 16, pp. 81-85, 1998.
- [58] H. Agteresch, «Beneficial effects of adenosine triphosphate on nutritional status in advanced lung cancer patients: a randomized clinical trial.,» *J Clin Oncol*, n. 20, pp. 371-378, 2002.
- [59] S. Salati, «Role of CD34 antigen in myeloid differentiation of human hematopoietic progenitor cells.,» *Stem Cell*, vol. 4, n. 26, pp. 950-959, 2008.
- [60] M. Ricciardi, «Reduced susceptibility to apoptosis correlates with kinetic quiescence in disease progression of chronic lymphocytic leukaemia.,» *Br J Haematol*, vol. 2, n. 113, pp. 391-399, 2001.
- [61] A. Tafuri, «DNA and RNA flow cytometric study in multiple myeloma. Clinical correlations.,» *Cancer*, vol. 2, n. 67, pp. 449-454, 1991.
- [62] M. Shabbir, «Effect of extracellular ATP on the growth of hormone-refractory prostate cancer in vivo.,» *BJU Int*, vol. 1, n. 102, pp. 108-112, 2008.
- [63] M. Shabbir, «Purinergic receptor-mediated effects of ATP in high-grade bladder cancer.,» *BJU Int*, vol. 1, n. 10, pp. 106-112, 2008.
- [64] N. White, «An in vivo model of melanoma: treatment with ATP.,» *Purinergic Signal*, vol. 3, n. 5, pp. 327-333, 2009.
- [65] E. Rapaport, «Anticancer activities of adenine nucleotides in mice are mediated through expansion of erythrocyte ATP pools.,» *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 5, n. 86, pp. 1662-1666, 1989.
- [66] H. Mellor, «The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer.,» *Cancer Metastasis Rev*, Vol. 23-4, n. 26, pp. 553-566, 2007.
- [67] G. Pan, «Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor.,» *FEBS Lett*, vol. 3, n. 431, pp. 351-356, 1998.
- [68] L. Mullauer, «Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease.,» *Mutat Res*, vol. 3, n. 488, pp. 211-231, 2001.
- [69] F. Lang, «Colorectal carcinoma cells--regulation of survival and growth by SGK1.,» *J Biochem Cell Biol*, vol. 10, n. 42, pp. 1571-1575, 2010.
- [70] D. Williams, «Rho GTPases and regulation of hematopoietic stem cell localization.,» *Methods Enzymol*, n. 439, pp. 365-393, 2008.
- [71] L. Chen, «CHD1L promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis in mice and is associated with these processes in human patients.,» *J Clin Invest*, n. 120, pp. 1178-1191, 2010.
- [72] J. Kzhyshkowska, «Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions.,» *J Cell Mol Med*, n. 10, pp. 635-649, 2006.
- [73] E. Adinolfi, «P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic

- B lymphocytic leukemia.,» *Blood*, vol. 2, n. 99, pp. 706-708, 2002.
- [74] M. Slater, «Early prostate cancer detected using expression of nonfunctional cytolytic P2X7 rece,» *Histopathology*, vol. 3, n. 44, pp. 206-215, 2004.
- [75] L. Raffaghello, « The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism.,» *Cancer Res*, n. 66, p. 907–914, 2006.
- [76] F. Di Virgilio, «The P2X7 receptor of CLL lymphocytes-a molecule with a split personality,» *Lancet*, vol. 360, n. 9349, pp. 1898-1899, 2002.
- [77] J. Wiley, «A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study,» *Lancet*, vol. 359, n. 9312, pp. 1114-1119, 2002.
- [78] L. Rossi, «The extracellular UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration,» *Blood*, vol. 109, n. 2, pp. 533-542, 2007.
- [79] M. Wang, «P2Y nucleotide receptor interaction with alpha integrin mediates astrocyte migration.,» *J Neurochem*, vol. 3, n. 95, pp. 630-640, 2005.
- [80] T. Müller, «The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation.,» *Allergy*, vol. 12, n. 65, pp. 1545-1553, 2010.
- [81] R. Lemoli, «Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo,» *Blood*, vol. 6, n. 104, pp. 1662-1670, 2004.
- [82] E. Adinolfi, «P2X7 receptor: Death or life?,» *Purinergic Signal*, vol. 3, n. 1, pp. 219-227., 2005.
- [83] L. Raffaghello, «The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism,» *Cancer Res.*, vol. 2, n. 66, pp. 907-914, 2006.
- [84] X. Zhang, « Expression of P2X7 in human hematopoietic cell lines and leukemia patients.,» *Leuk Res*, n. 28, pp. 1313-1322, 2004.
- [85] J. Chong, « Abnormal expression of P2X family receptors in Chinese pediatric acute leukemias.,» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 1, n. 39, pp. 498-504, 2010.
- [86] «Shabbir M, Burnstock G. Purinergic receptor-mediated effects of adenosine 5'-triphosphate in urological malignant diseases.,» *Int J Urol*, vol. 2, n. 16, pp. 143-150, 2009.
- [87] E. Rapaport, «Experimental cancer therapy in mice by adenine nucleotides.,» *Eur J Cancer Clin Oncol*, vol. 9, n. 24, pp. 1491-1497, 1988.
- [88] A. Conigrave, «Extracellular ATP-dependent suppression of proliferation and induction of differentiation of human HL-60 leukemia cells by distinct mechanisms.,» *Biochem Pharmacol*, vol. 11, n. 60, pp. 1585-1591, 2000.
- [89] r. S. Beije, « Effect of adenosine 5'-triphosphate infusions on the nutritional status and survival of preterminal cancer patients.,» *Anticancer Drugs*, vol. 7, n. 20, pp. 625-633, 2009.

- [90] H. Agteresch, «Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications.,» *Drugs*, vol. 2, n. 58, pp. 211-232, 1999.
- [91] H. Agteresch, « Pharmacokinetics of intravenous ATP in cancer patients.,» *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 1, n. 56, pp. 49-55, 2000.
- [92] H. Agteresch, « Randomized clinical trial of adenosine 5'-triphosphate on tumor growth and survival in advanced lung cancer patients.,» *Anticancer Drugs*, vol. 8, n. 14, pp. 639-644, 2003.
- [93] J. Stagg, « Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer.,» *Oncogene*, vol. 39, n. 29, pp. 5346-5358, 2010.
- [94] B. Spungin, «Growth inhibition of breast cancer cells induced by exogenous ATP.,» *J Cell Physiol*, vol. 3, n. 157, pp. 502-508, 1993.
- [95] A. Surprenant, «The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7).,» *Science*, vol. 5262, n. 272, pp. 735-738, 1996.
- [96] W. Wei, « Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 glioma cells.,» *Cancer Lett*, Vol. %1 di %21-2, n. 260, pp. 79-87, 2008.
- [97] S. Leij-Halfwerk, «Adenosine Triphosphate infusion increases liver energy status in advanced lung cancer patients: an in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study,» *Hepatology*, n. 35, pp. 421-424, 2002.
- [98] M. Kato, «Adenosine 5'-Tiphosphate induced dilatation of human coronary microvessel in vivo,» *Internal Medicine*, n. 38, pp. 324-329, 1999.