



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**

**Dottorato di Ricerca Internazionale in Biomedicina Traslazionale  
XXXIV CICLO**

**Ph.D Daniela Cambria**

**Alterazioni immunologiche su cellule mesenchimali stromali e linee  
cellulari di Leucemia Mieloide Cronica (LMC)**

**Coordinatore:**

**Prof. Lorenzo Malatino**

**Tutor:**

**Prof. Francesco Di Raimondo**

# Sommario

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>2</b>
<b>Il microambiente tumorale</b> .....	<b>8</b>
<b>Il sistema IGF</b> .....	<b>12</b>
<b>La via di segnalazione Hedgehog (Hh)</b> .....	<b>16</b>
<b>I recettori toll-like (TLR)</b> .....	<b>18</b>
<b>OBIETTIVI DELLO STUDIO</b> .....	<b>20</b>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>21</b>
<b>Colture cellulari</b> .....	<b>21</b>
<b>Saggio XTT</b> .....	<b>22</b>
<b>Analisi Western blot</b> .....	<b>23</b>
<b>Immunofluorescenza</b> .....	<b>24</b>
<b>Analisi mediante Real time PCR quantitativa</b> .....	<b>25</b>
<b>Analisi statistica</b> .....	<b>26</b>
<b>RISULTATI</b> .....	<b>27</b>
<b>Il Dasatinib non influenza la vitalità dello stroma e la co-coltura LAMA-84/HS5 conferisce resistenza alle LAMA-84 rendendo lo stroma glicolitico e pro-infiammatorio</b> .....	<b>27</b>
<b>Il Dasatinib incrementa i livelli di IGFBP-6 nelle co-culture e il pre-trattamento con IGFBP-6 determina una minore mortalità delle LAMA-84 al Dasatinib</b> .....	<b>29</b>
<b>IGFBP-6 determina la trasformazione delle HS-5 in CAF</b> .....	<b>31</b>
<b>IGFBP-6 incrementa i livelli di espressione di ShH</b> .....	<b>33</b>
<b>Il pre-trattamento con IGFBP-6 incrementa i livelli di espressione di SHH nelle co-culture</b> .....	<b>35</b>
<b>Il trattamento combinato IGFBP-6/Dasatinib incrementa lo stato infiammatorio delle HS-5 e attiva il TLR4</b> .....	<b>38</b>
<b>Il trattamento combinato IGFBP-6/Dasatinib incrementa lo stato infiammatorio delle LAMA-84 e attiva il TLR4</b> .....	<b>40</b>
<b>IGFBP-6 e SHH sono correlati tra loro ed entrambi modulano la via del TLR4</b> .....	<b>43</b>
<b>IGFBP-6 e PMO determinano una riduzione della mortalità delle LAMA-84 trattate con Dasatinib</b> .....	<b>45</b>
<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>46</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>50</b>

## INTRODUZIONE

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è un disordine mieloproliferativo che si origina nel compartimento delle cellule staminali ematopoietiche (CSE) del midollo osseo (1). La LMC viene diagnosticata meno frequentemente rispetto alle altre forme di leucemia; l'età media alla diagnosi è di 56-57 anni nei paesi Occidentali con un'incidenza di 1-2 casi ogni 100.000 abitanti (2-4).

È stata descritta per la prima volta tra il 1844 e il 1845 quando Virchow coniò il termine leucemia. Fin da subito si capì che il midollo osseo rappresentava il tessuto dal quale prendeva origine questa patologia anche se la diagnosi accurata fu possibile solo 82 anni dopo, quando venne scoperto il cromosoma Philadelphia (cromosoma Ph) caratterizzato dalla traslocazione tra il cromosoma 9 e il cromosoma 22  $t(9;22)$  la quale rappresenta il tratto distintivo della patologia (4).

Il cromosoma Philadelphia, a livello molecolare, si origina dalla giustapposizione della parte 5' del gene *bcr* alla parte 3' del gene *abl*, e il gene di fusione che si origina può includere differenti parti dei due geni dando origine a un gene ibrido che presenta un'attività tirosin-chinasica costitutiva (5).

A seconda del punto di rottura a livello del gene *bcr*, si possono formare diversi tipi di trascritti che codificano per differenti isoforme proteiche di BCR-ABL tra cui le più comuni sono la p210 e la p190. L'isoforma p210 è costituita da 501 aminoacidi, è il 25% più estesa rispetto alla p190, ed è l'isoforma che caratterizza la LMC.

La proteina BCR-ABL, inoltre, è espressa nel 20-30% di adulti con leucemia linfoblastica acuta a cellule B (LLA-B), in cui solo circa un quarto dei casi esprime la p210 e tre quarti esprimono l'isoforma BCR-ABL p190. A differenza della LMC, la LLA-B è spesso accompagnata da mutazioni aggiuntive e la sopravvivenza è drammaticamente bassa a causa della ricaduta e della resistenza agli inibitori delle chinasi (6).

La proteina ad attività tirosin-chinasica ABL, nell'uomo è codificata dal gene *abl* localizzato sul cromosoma 9. Solitamente con il termine *c-abl* ci si riferisce al gene

espresso nel genoma dei mammiferi, mentre con *v-abl* al gene virale che fu inizialmente isolato dal virus della leucemia murina di Abelson.

*Abl* è un protooncogene che codifica per una proteina con attività tirosin-chinasica a localizzazione sia citoplasmatica che nucleare, implicata nei processi di differenziamento, divisione, adesione cellulare e risposta a stress. A livello nucleare la proteina è legata alla cromatina, invece a livello citoplasmatico co-localizza con l'F actina.

La metà amino-terminale della proteina ABL contiene le regioni di omologia *Src*: SH1, SH2 e SH3. Il dominio SH1 ha attività catalitica, il dominio SH2 ha attività di legame fosfotirosinico, mentre l'attività della proteina ABL è regolata negativamente dal dominio SH3 la cui delezione comporta la trasformazione di *abl* in un oncogene.

La metà carbossi-terminale della proteina ABL codifica per un motivo ricco in lisina necessario per la localizzazione nucleare, un dominio bipartito di legame al DNA così come i domini di legame all'F e G actina (7).

Nonostante la funzione del gene di fusione *bcr-abl* è stata largamente studiata, poco si conosce per il gene *bcr*. Il gene *bcr* è localizzato sul cromosoma 22 e codifica per una proteina con attività serina/treonina chinasica, la quale è un fattore di scambio nucleotidico della guanina per le GTPasi della famiglia Rho, inclusa la RhoA.

Il dominio di oligomerizzazione dell'oncoproteina BCR-ABL a livello della porzione N-terminale del gene *bcr* è essenziale per l'oncogenicità della proteina di fusione. Tale dominio consiste di una corta elica N-terminale ( $\alpha 1$ ), un loop flessibile e una lunga elica C-terminale ( $\alpha 2$ ). Nel complesso queste formano una struttura a forma di N, con il loop che permette alle due eliche di assumere un orientamento parallelo.

I domini monomerici si associano in un dimero attraverso la formazione di una struttura *coiled coil* antiparallela tra le eliche  $\alpha 2$  e lo scambio di domini delle due eliche  $\alpha 1$ , dove un'elica  $\alpha 1$  oscilla indietro e si impacchetta contro l'elica  $\alpha 2$  dal secondo monomero. I due dimeri si associano a formare un tetramero (8).

La proteina ABL fisiologicamente trasloca tra il nucleo e il citoplasma, tuttavia, quando si forma la proteina di fusione BCR-ABL, tale caratteristica viene perduta e

l'oncoproteina è principalmente presente a livello citoplasmatico, dove interagisce con la maggior parte delle proteine coinvolte nel pathway oncogenico.

L'attività tirosin chinasi di ABL è costitutivamente attivata dalla giustapposizione di BCR, che favorisce la dimerizzazione o la tetramerizzazione e conseguente autofosforilazione.

Questo determina l'aumento del numero di residui di fosfotirosina su BCR-ABL e, di conseguenza, i siti di legame per i domini SH2 di altre proteine. Alterazioni nelle interazioni tra BCR-ABL e le altre molecole citoplasmatiche porta alla disregolazione dei meccanismi chiave delle cellule.

Tra i pathway che vengono influenzati da questa disregolazione troviamo la via delle MAPK (Ras-mitogen-activated protein kinase) la quale determina un aumento della proliferazione cellulare, la via JAK-STAT (Janus-activated kinase) con conseguente riduzione dell'attività trascrizionale ed infine la via PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase) con conseguente aumento dell'apoptosi (9).

La porzione amino-terminale di BCR codifica una sequenza di BCR-ABL che contiene un sito tirosina-fosforilato che lega il dominio SH2 della proteina adattatrice GRB2 (10).

È evidente che la fosforilazione della tirosina in posizione 177 (Tyr177) di BCR è essenziale per la leucemogenesi mediata da BCR-ABL, (11) e la sua mutazione sopprime largamente il legame alla proteina GRB2 (10).

BCR-ABL interagisce con altre proteine citoplasmatiche, ad esempio molecole adattatrici, creando complessi multiproteici di segnale.

Il complesso BCR-ABL/GRB2 recluta *Son of Sevenless* (SOS), che è costitutivamente associato al dominio SH3 di GRB2 (12).

A sua volta, il complesso BCR-ABL/GRB2/SOS determina l'attivazione di Ras mediante la conversione del GDP a GTP e l'attivazione della proteina scaffold associata a GRB2 (GAB2) (13,14).

Il complesso GRB2/GAB2/SOS, di conseguenza, attiva costitutivamente la via a valle di Ras, attivando così le proteine della chinasi regolata dal segnale extracellulare

(ERK) 1/2 (MEK) della proteina attivata da mitogeno (MAP) e della chinasi MAP, determinando un'anormale proliferazione cellulare. Questo complesso, inoltre attiva la via PI3K/AKT la quale promuove la sopravvivenza cellulare mediante soppressione dell'attività del fattore di trascrizione FOXO, e incrementa la proliferazione cellulare inducendo la degradazione proteosomale di p27 e l'attivazione di mTOR.

BCR-ABL, inoltre, attraverso il complesso PI3K/AKT/FOXO e alla fine mediante upregolazione di mTOR, blocca i più importanti processi cellulari come ad esempio l'autofagia. BCR-ABL può attivare PI3K mediante diverse vie poiché è stato dimostrato che Crk e Crk1 collegano BCR-ABL con PI3K.

Una volta attivato, PI3K attiva la chinasi AKT che funge da effettore chiave esercitando molti effetti cellulari mediante la fosforilazione dei substrati che si trovano a valle della via e che regolano il meccanismo apoptotico (ad esempio, Bad, caspasi 9, Mdm2 e Ask1). Come risultato si osserva un aumento della sopravvivenza cellulare e l'espansione del clone mutato (15-17).

Tra i fattori di trascrizione coinvolti nelle vie di segnalazione ~~nel signaling~~ di BCR-ABL, un ruolo fondamentale è rivestito da STAT1 e STAT5 (signal transducer and activation of transcription), i quali sono costantemente attivi nelle linee cellulari positive per BCR-ABL e nelle cellule primarie di pazienti affetti da LMC (18).

Nelle cellule sane, la traslocazione nucleare delle proteine STAT si verifica esclusivamente dopo il legame delle citochine ai loro recettori ed è mediata dall'attivazione delle chinasi JAK associate al recettore. Nella LMC, sembra che STAT sia attivato in maniera indipendente da JAK attraverso l'associazione diretta del dominio SH2 di STAT con le tirosine fosforilate a livello di BCR-ABL (19).

L'attivazione di STAT5 è almeno in parte responsabile della protezione dalla morte cellulare programmata attraverso l'aumento dei livelli di espressione della molecola antiapoptotica BCL-xL insieme all'inattivazione della molecola proapoptotica BAD da parte di AKT.

Un altro target nucleare coinvolto nell'attività trasformante della proteina BCR-ABL è il protooncogene MYC, che è espresso a livelli elevati nelle cellule di LMC.

L'attivazione di MYC sembra essere indipendente dalla via RAS ma direttamente upregolata dal dominio SH2 di ABL.

Diversi studi dimostrano che i livelli di Myc sono spesso aumentati durante la fase di crisi blastica rispetto alla fase cronica collegandolo dunque alla progressione della malattia; infatti, l'inibizione in vitro di c-Myc con oligonucleotidi antisenso ha dimostrato che può essere inibita la trasformazione BCR-ABL o la leucemogenesi.

Tutte le vie di segnalazione signaling attivate risultano nella perdita di controllo della proliferazione e nell'espansione del clone leucemico (20).

Strutturalmente, BCR-ABL contiene domini multipli e il dominio SH2 di Bcr-Abl recluta proteine di segnale come p62dok, c-Cbl, e Rin1.

Il legame e la fosforilazione di queste molecole possono essere funzionalmente importanti poiché le mutazioni SH2 in BCR-ABL influenzano il decorso della malattia nei modelli biologici. Il dominio di legame dell'actina collega direttamente BCR-ABL al citoscheletro e facilita la fosforilazione della tirosina delle proteine citoscheletriche (21).

La LMC è una patologia bifasica, la cui origine si identifica con l'espressione del gene di fusione BCR-ABL nelle cellule staminali ematopoietiche (CSE). Le CSE possono differenziare nei progenitori mieloidi comuni (CMPs), i quali differenziano ulteriormente nei progenitori granulociti-macrofagici (GMPs); progenitori dei granulociti e macrofagi e megacariociti/eritrociti (MEPs; progenitori delle cellule rosse del sangue (RBCs) e megacariociti (MEGs), i quali producono le piastrine).

Le cellule staminali ematopoietiche possono anche differenziare nei progenitori comuni linfoidi (CLPs), che sono i progenitori dei linfociti T e B. La fase cronica iniziale della LMC (LMC-CP) è caratterizzata da una massiva espansione della linea granulocitaria. L'acquisizione di mutazioni geniche addizionali oltre l'espressione di BCR-ABL causa la progressione della LMC dalla fase cronica alla fase blastica (LMC-BP), caratterizzata da un accumulo di blasti mieloidi (circa i due terzi dei pazienti) o blasti linfoidi (circa un terzo dei pazienti). Sebbene le cellule della LMC siano multipotenti, la produzione di cellule B che si originano dal clone neoplastico si

verifica raramente, e sono identificabili poco frequentemente i precursori delle cellule T. La linfopoiesi, in particolar modo lo sviluppo delle cellule T, è compromessa dall'espressione di BCR-ABL (13).

Lo sviluppo degli inibitori delle tirosin-chinasi di BCR-ABL (TKI) ha rivoluzionato la terapia per la LMC. I TKI sono altamente efficaci nell'indurre la remissione, nel prevenire la progressione della malattia e prolungare la sopravvivenza dei pazienti durante la fase cronica. Il trattamento con TKI presenta, tuttavia, delle limitazioni come il fallimento della terapia in un sottogruppo di pazienti, correlato ad una risposta inadeguata, progressione della malattia, tossicità ai farmaci che preclude la loro somministrazione e persistenza delle cellule staminali leucemiche (CSL) nella maggior parte dei pazienti, così che solo una piccola percentuale di pazienti può mantenere la remissione libera da trattamento (TFR) dopo aver interrotto il trattamento con TKI. Il trattamento prolungato con TKI determina il rischio di non-compliance, associato con rischio di relapse e progressione; tossicità, incluse serie complicazioni vascolari; effetti teratogeni, che precludono la possibilità di gravidanza durante il trattamento. È noto che le CSL di LMC sono resistenti agli effetti dei TKI e persistono nei pazienti in terapia prolungata. Nonostante un sottogruppo di pazienti in fase cronica riesce a mantenere la remissione dopo l'interruzione dei TKI, molti pazienti hanno necessità di terapia continua per prevenire la ricaduta (22, 23).



## **Il microambiente tumorale**

Il microambiente tumorale (TME) è costituito dalla matrice extracellulare (ECM), cellule stromali, fibroblasti, cellule mesenchimali, periciti, occasionalmente da adipociti, reti vascolari linfatiche e sanguigne e cellule dell'immunità come i linfociti T e B, cellule natural killer e macrofagi associati al tumore (TAM) (24).

Diversi studi dimostrano il coinvolgimento del TME nelle alterazioni delle funzioni tissutali, che svolge un ruolo critico nella successiva evoluzione dei tumori maligni.

I processi iniziali dello sviluppo del tumore si basano su una serie complessa di eventi biologici che si verificano su cellule sane le quali vanno incontro a iperplasia, crescita incontrollata e resistenza all'apoptosi (25, 26).

Le fasi iniziali della crescita tumorale sono associate al rimodellamento del microambiente tumorale che si caratterizza per un aumento dello stress ossidativo e acidosi, dovute a una variazione del metabolismo cellulare associato a un aumento dell'ipossia; tutto ciò determina displasia, la quale si manifesta con una popolazione eterogenea di cellule tumorali con differenti tratti fenotipici e genetici (27, 28).

Questi eventi sono orchestrati da comunicazioni autocrine e paracrine tra le cellule stromali e le cellule del sistema immunitario adiacenti al tumore, accoppiate con un incremento della pressione del fluido interstiziale. Lo scambio di molecole tra le cellule del microambiente determina la progressione tumorale con conseguente aumento della rigidità della matrice extracellulare, formazione di vasi sanguigni e linfatici, possibile comparsa di regioni necrotiche e metastasi (29).

Le cellule staminali cancerose sono cellule con la capacità di auto-rinnovarsi e guidare la tumorigenesi e il loro (30) isolamento da pazienti affetti da tumore al colon, al polmone e tumori ematologici ha permesso di comprendere meglio le caratteristiche del microambiente tumorale e di identificare nuovi target per la diagnosi e la gestione della malattia (25).

La progressione e lo sviluppo del tumore è altamente influenzata dall'interazione tra cellule sane e cellule tumorali in quanto le prime spesso svolgono una funzione pro-

tumorale in tutte le fasi iniziali stimolando la proliferazione incontrollata per mezzo di citochine, mentre le seconde invadono i tessuti sani attraverso il sistema linfatico e circolatorio (31,32).

Le cellule endoteliali del TME giocano un ruolo chiave nello sviluppo del tumore e nella protezione delle cellule tumorali dagli attacchi da parte del sistema immunitario. Le cellule immunitarie, come granulociti, linfociti e macrofagi sono coinvolte in varie risposte e attività immunitarie, tra cui l'infiammazione. La componente immunitaria è fondamentale nei processi di progressione tumorale in quanto responsabile dei meccanismi di immunoescape.

Diversi studi hanno dimostrato che lo stroma influenza l'omeostasi attraverso il controllo della crescita delle cellule tumorali, i processi di metastatizzazione e invasione. L'angiogenesi e la presenza di cellule del sistema immunitario che favoriscono la crescita tumorale nel TME, determina l'ulteriore sviluppo delle cellule staminali tumorali favorendo i meccanismi di resistenza terapeutica (33, 34).

Il microambiente del midollo osseo è caratterizzato da una moltitudine di tipi cellulari con ruoli importanti nell'osteogenesi, nell'adipogenesi e nel mantenimento del sistema vascolare, garantendo principalmente il mantenimento della funzione delle cellule staminali ematopoietiche (CSE) e la regolazione della produzione delle cellule del sangue. Diversi studi dimostrano che nelle malattie ematopoietiche maligne o anche nei processi infiammatori, una disfunzione dell'interazione tra cellule staminali ematopoietiche, cellule progenitrici (HSPC) e popolazioni di cellule staminali determina un'alterazione nella regolazione dell'ematopoiesi e favorisce un fenotipo secretorio del microambiente, il quale non supporta in maniera efficace l'ematopoiesi (35, 36).

La principale funzione del microambiente nel midollo osseo (BM) è di fornire segnali che regolano e supportano la produzione delle cellule del sangue necessarie al mantenimento dell'omeostasi. Il microambiente tumorale del midollo osseo meglio caratterizzato è la nicchia midollare che regola l'ematopoiesi delle cellule staminali.

Diversi studi hanno dimostrato che la nicchia è principalmente perivascolare, è costituita da numerosi tipi di cellule e che i vasi sanguigni e le cellule stromali perivascolari sono i componenti chiave (37).

L'infiammazione è un meccanismo di risposta immunitaria protettiva come conseguenza di processi patofisiologici iniziati da agenti infettivi e/o danno tissutale. In condizioni normali, le cellule staminali ematopoietiche sono in uno stato quiescente. In risposta all'infiammazione, iniziano rapidamente a perdere la quiescenza e proliferano transitoriamente.

È stato dimostrato che L'IFN- $\gamma$  influenza principalmente l'auto-rinnovamento e la capacità di ripopolamento dei progenitori ematopoietici moderando la loro risposta ad altre citochine.

Nel microambiente del midollo l'infiammazione ha un duplice ruolo, da un lato agisce promuovendo il normale sviluppo e funzione delle CSE in situazioni di stress acuto, dall'altro lato ne promuove la deregolamentazione e l'alterazione funzionale (38).

Nella LMC, la proteina BCR-ABL, con attività tirosin-chinasica costitutiva trasforma le cellule staminali ematopoietiche o le cellule progenitrici ematopoietiche in CSL. Le CSL possiedono attività di auto-rinnovamento, proliferazione e differenziamento sotto influenza dei segnali del microambiente del midollo osseo (nicchia e cellule staminali ematopoietiche). L'interazione con il midollo osseo è indispensabile per l'iniziazione, il mantenimento e la progressione della LMC. Tuttavia, il crosstalk tra le cellule staminali leucemiche e il microambiente del midollo osseo può far assumere alle cellule stromali un fenotipo pro-infiammatorio che ne determina la trasformazione in fibroblasti associati al tumore (CAF) che giocano un ruolo fondamentale nell'insorgenza della resistenza alla terapia (39).

Diversi studi dimostrano che l'inibizione dell'attività tirosin-chinasica della p210 BCR-ABL riduce i livelli della proteina CXCR4 la quale potrebbe favorire il rilascio delle cellule staminali leucemiche di LMC dal microambiente del midollo osseo al sangue. Livelli elevati di CXCR4, invece, innescano l'homing delle cellule CSL verso

il microambiente del midollo osseo evento che induce la quiescenza e la resistenza ai TKI (40).

I TKI hanno un forte effetto antiproliferativo sulle CSL ma inducono un modesto livello di apoptosi, infatti le CSL quiescenti sono particolarmente resistenti all'apoptosi indotta dai TKI.

Diversi studi hanno dimostrato che i TKI inibiscono l'attività chinasi nelle CSL e che la loro resistenza è tuttavia indipendente dall'attività chinasi di BCR-ABL.

Questi dati hanno avuto un enorme impatto nella definizione della direzione da seguire sulla ricerca nella LMC (41).

## **Il sistema IGF**

Il Sistema IGF gioca un ruolo fondamentale nella crescita e nello sviluppo cellulare e, quando de-regolato, fornisce un grosso contributo all'evoluzione della malattia (42).

Tale sistema comprende diversi complessi proteici a cui appartengono IGF-I, IGF-II, le loro proteine di legame ad alta affinità (IGFBP da 1 a 6), i relativi peptidi a bassa affinità (IGFBP da rP1a 4) e le proteasi IGFBP, che nell'insieme svolgono funzioni regolatorie fondamentali per la crescita e per il metabolismo dei carboidrati.

Le proteine IGF esercitano le loro azioni mitogeniche principalmente attraverso l'attivazione del recettore IGF di tipo 1 (IGF-1R), tirosin-chinasi eterotetrameriche presenti sulla superficie cellulare, mentre le IGFBP rappresentano la più grande famiglia di proteine che legano IGF con alta affinità e specificità regolandone l'attività. Le IGF legano con elevata affinità IGF-1R e tale interazione determina l'attivazione di pathway associati alla proliferazione, infatti, è stato ampiamente dimostrato che questo sistema è coinvolto nella crescita tumorale e nei processi di rimodellamento della matrice extra-cellulare i quali influenzano la metastatizzazione (43, 44).

In condizioni fisiologiche, questo sistema è finemente regolato ma l'insorgere di anomalie genetiche e/o cromosomiche determinano un'alterazione nell'espressione di IGF e IGF-1R con conseguente disregolazione e alterazione funzionale, come osservato nel tumore al seno, gastrointestinale e nell'osteosarcoma (45-48)

Le azioni cellulari sono determinate dai livelli di IGF libere e non legate i quali dipendono dal tasso di produzione di IGF, dalla loro clearance e dal grado di affinità alle IGFBP. È stata dimostrata l'esistenza di diverse azioni delle IGFBP, indipendenti dal legame con IGF e correlate con la sopravvivenza, la proliferazione e il metabolismo. Ad esempio, l'upregolazione di IGF-1R che si verifica frequentemente nei tumori solidi, è secondaria alla perdita dell'attività di geni regolatori della soppressione tumorale inclusi BRCA1, WT1, TP53 e vHL (49). L'aumento dei livelli di espressione e/o l'attivazione dei componenti dell'asse IGF promuovono l'attivazione della via classica tramite effettori inclusi AKT ed ERK che contribuiscono alla

resistenza alle terapie antitumorali, tra cui chemioterapia, radioterapia, terapia endocrina e agenti mirati. È ampiamente riconosciuto, infatti, che la crescita tumorale, le metastasi e la resistenza alla terapia può essere promossa dalla secrezione di IGF da parte delle cellule stromali tumorali (42). Le IGFBP sono state identificate inizialmente come carrier sierici e inibitori passivi dell'azione delle IGF. Tuttavia, studi successivi hanno dimostrato che, sebbene le IGFBP in molte circostanze inibiscano l'azione delle IGF, in altri casi possono potenziarne l'attività.

Le IGFBP sono ampiamente espresse in molti tessuti, sono regolatori flessibili ad azione endocrina, autocrina e paracrina dell'attività di IGF. Recentemente, è stato dimostrato che alcune IGFBP hanno azione indipendente dal legame con IGF. Meccanismi che sottolineano queste azioni includono le interazioni con proteine non-IGF nello spazio extracellulare e nella matrice, sulla superficie cellulare e nello spazio intracellulare, interazione e modulazione di vie di altri fattori di crescita incluso EGF, TGF  $\beta$ , e VEGF ed effetti trascrizionali diretti e indiretti dopo l'ingresso nucleare di IGFBP. Attraverso azioni IGF dipendenti e indipendenti, le IGFBP modulano processi cellulari fondamentali incluse la proliferazione, la sopravvivenza, la migrazione la senescenza, l'autofagia e l'angiogenesi. Sono implicate in un'ampia gamma di disordini inclusi i tumori, malattie metaboliche e neurologiche e disordini immunologici (50).

Sebbene non siano stati identificati specifici recettori per IGFBP, sono state identificate 14 molecole di legame per IGFBP. IGFBP1 interagisce con l'integrina  $\alpha 5\beta 1$ , influenzando l'adesione e la migrazione cellulare; IGFBP 2-3-5-6 hanno domini di legame per l'eparina e possono legare i glicosamminoglicani; IGFBP 3-5 hanno motivi di base carbossi-terminale che incorporano il legame dell'eparina e residui basici aggiuntivi che interagiscono con la superficie e la matrice cellulare (transferrina, collagene di tipo 1) così come il trasportatore nucleare importina- $\beta$ .

Sia IGFBP-3 che IGFBP-5 presentano siti di legame per i recettori della serina / treonina chinasi ma nonostante le IGFBP interagiscano con numerose proteine della

superficie cellulare, non sono state caratterizzate proteine specifiche con attività di recettori funzionali (51).

La principale funzione di IGFBP-6 consiste nell'inibizione di IGF-II e quindi delle sue attività quali la proliferazione, il differenziamento, la migrazione e la sopravvivenza cellulare; ma ha effetto ridotto o nullo sull'azione di IGF-I, in parte dovuto alla bassa affinità di IGFBP-6 per questo ligando (52, 53).

Come le altre IGFBP, anche IGFBP-6 può agire mediante meccanismi dipendenti e indipendenti dal legame con IGF. Molti tipi di cancro over-esprimono IGF2, ed *in vivo* è stato dimostrato come IGFBP-6 inibisce lo xenograft di due tumori, il neuroblastoma e il rabdiomiosarcoma (54, 55).

Diversi studi hanno dimostrato, inoltre, che l'espressione di IGFBP-6 è più bassa nelle cellule tumorali rispetto alle cellule sane (56), a causa dell'ipermetilazione del promotore di IGFBP-6, e che questi bassi livelli sono associati a una prognosi sfavorevole nel cancro nasofaringeo e gastrico (57).

IGFBP-6 inibisce la proliferazione dei fibroblasti attraverso meccanismi sia dipendenti che in dipendenti da IGF-II (58) è in grado di entrare nel nucleo mediante una sequenza di localizzazione nucleare nel dominio C terminale che interagisce con l' $\alpha$ -importina, e la delezione di questa sequenza impedisce l'apoptosi mediata da IGFBP-6 (59), inibisce l'angiogenesi basale mediata da VEGF attraverso meccanismi indipendenti da IGF in vitro, così come lo xenograft nel rabdomiosarcoma e negli embrioni di zebrafish in vivo. IGFBP-6 può limitare la risposta angiogenica all'ipossia, la quale lentamente incrementa la sua espressione. IGFBP-6 incrementa la migrazione cellulare delle cellule tumorali attraverso meccanismi IGF indipendenti che includono il legame della proibitina-2 alla superficie cellulare e l'attivazione della via delle MAP chinasi (60, 61).

IGFBP-6 può inoltre essere coinvolto nella regolazione immunitaria. Un recente studio sull'infezione nei pesci ha dimostrato che le citochine proinfiammatorie aumentano l'espressione di IGFBP-6 e IGFBP-1, che sembrano promuovere l'attivazione del sistema immunitario limitando l'utilizzo di energia per la crescita mediata da IGF (62).

Tra le varie funzioni svolte, IGFBP-6 sembra che sia necessario per lo sviluppo dei linfociti pre-B in vitro, inoltre le cellule dendritiche sottoposte a ipertemia aumentano i livelli di espressione di IGFBP-6 il quale promuove la chemiotassi dei monociti e linfociti T, suggerendo un possibile ruolo nella risposta immunitaria adattativa. IGFBP-6 inoltre incrementa la migrazione delle cellule T in soggetti con artrite reumatoide ma non nei soggetti controllo, evidenziando un ruolo anche nelle malattie autoimmuni (63).



## La via di segnalazione Hedgehog (Hh)

La via di segnalazione Hedgehog (Hh) è stata descritta per la prima volta nel moscerino della frutta. È un pathway di trasmissione del segnale dalla membrana cellulare al nucleo, evolutivamente molto conservato. Questo pathway gioca un ruolo fondamentale nel normale sviluppo degli invertebrati e dei vertebrati (64).

È prevalentemente inattivo o poco attivo negli organismi adulti, e viene attivato, per esempio nei meccanismi di guarigione delle ferite (65).

Hh è coinvolto nel mantenimento delle cellule staminali somatiche e nelle cellule pluripotenti che sono importantissime per la riparazione dei tessuti, infatti è stato dimostrato che tale via di segnalazione è fondamentale per la rigenerazione dell'epitelio polmonare, dell'epitelio prostatico e delle cellule del pancreas esocrino (66-68).

Alcuni studi indicano che la segnalazione di Hh può essere coinvolta in vari stadi di carcinogenesi in diversi tumori. Ad esempio, nel cancro del pancreas e dell'esofago, l'attivazione di questa via di segnalazione si trova nelle prime fasi del processo tumorale così come nei tumori metastatici (69-70).

In altri tumori, come il cancro gastrico e il cancro alla prostata, l'attivazione della via di Hh è associata all'invasione dei tessuti e all'aumento del potenziale metastatico. In accordo con questi risultati, l'inibizione della via di segnalazione Hh riduce la proliferazione delle cellule tumorali nel cancro della prostata e dello stomaco (71).

L'attivazione di questa via prevede il coinvolgimento di tre proteine: il ligando Hedgehog (HH) Patched (PTCH) and Smoothened (SMO) (72).

La via canonica di segnalazione inizia dal legame di HH alla proteina transmembrana Patched 1 (PTCH1). L'attività di SMO è costitutivamente repressa da PTCH1, e questa inibizione viene annullata dal legame di HH a PTCH1.

L'attivazione di SMO permette di trasmettere i segnali di attivazione di HH nel citoplasma, che alla fine rilascia fattori di trascrizione GLI precedentemente sequestrati nel citoplasma da parte del soppressore della fusione (SUFU). Ciò consente a GLI di

traslocare nel nucleo e legare bersagli trascrizionali per regolare l'espressione genica cellulare (73-74).

Questo pathway di attivazione del segnale può avvenire per via canonica, dove HH regola GLI, e per via non canonica dove non è coinvolta la proteina GLI.

È stato dimostrato che le cellule CD138+ di mieloma multiplo esprimono i geni *Hh*, e mediante l'utilizzo di un inibitore di SMO, è stata ridotta la vitalità cellulare mediante downregolazione di GLI1 e PTCH1 che sono i marker specifici dell'attività di HH. Inoltre, è stata dimostrata anche un'attività non canonica di HH in quanto è stato dimostrato che utilizzando Forskolin, un composto modulatore di GLI1, la traslocazione nucleare di GLI1 viene soppressa, confermando un meccanismo indipendente da SMO che porta all'attivazione di HH nel mieloma multiplo (75).

Delle tre glicoproteine HH, ShH (Sonic hedgehog), è la più espressa e la più potente (64). Prima della secrezione, ShH subisce diverse modificazioni, tra cui la rimozione della sua sequenza di segnalazione, la scissione catalizzata dal proprio dominio di proteasi C-terminale, l'aggiunta di colesterolo al dominio C-terminale per facilitare l'associazione con la membrana plasmatica, e infine l'aggiunta di un palmitato al dominio N-terminale che rende ShH completamente attiva (76-79).

## **I recettori toll-like (TLR)**

I recettori Toll-like appartengono alla superfamiglia dei recettori TLR-IL-1(TIR); presentano un dominio esterno costituito da ripetizioni ricche in leucina per il riconoscimento dei pattern molecolari associati ai patogeni (PAMPs) e un dominio TIR intracitoplasmatico che media il reclutamento di molecole adattatrici come il fattore di differenziazione mieloide (MyD88), la proteina associata a TIR(TIRAP), recettore Toll associato all'attivatore dell'interferone (TRIF) e/o molecole associate al recettore Toll (TRAM).

La maggior parte dei TLR sono espressi sulla superficie cellulare e legano lipidi e proteine come TLR1, 2, 4, 5, 6, mentre TLR3, 7, 8 e 9 si trovano a livello degli endosomi dove vengono attivati in seguito alla cattura e all'internalizzazione dei patogeni e dei loro prodotti (80,81).

Alcuni TLR di superficie vengono internalizzati in seguito al legame con il ligando; ad esempio, TLR2 è reclutato nei fagosomi magrofagici (82).

Anche se i TLR sono primariamente espressi nelle cellule ematopoietiche, la loro presenza è stata dimostrata anche nei cheratinociti cellule epiteliali dell'intestino e nel tratto urogenitale e respiratorio, e pare che forniscano una difesa antimicrobica che si somma all'azione meccanica della barriera dello strato epiteliale (83-85).

Diversi studi dimostrano che l'espressione dei TLR è associata alla prognosi di diversi tipi di tumore. Lo stesso recettore può avere un ruolo prognostico favorevole o sfavorevole (ad esempio TLR9) o in altri casi può essere associato a un outcome sfavorevole (TLR4).

Questa variabilità rende difficile lo studio globale di tali recettori nell'oncogenesi e nella progressione del cancro quindi la focalizzazione sui singoli recettori sicuramente rappresenta l'approccio migliore.

Le differenti popolazioni cellulari (cellule staminali cancerose, cellule tumorali, linfociti infiltranti il tumore, fibroblasti associati al tumore ecc..) possono avere

differente espressione dei TLR e quindi rispondere in maniera differente alla loro stimolazione (86,87).

A differenza dell'inflammatione acuta, l'inflammatione cronica è spesso associata alla progressione tumorale ed è uno dei tratti distintivi del cancro.

Le cellule infiammatorie producono fattori di crescita e sopravvivenza cellulare, fattori pro-angiogenici, enzimi modificanti la matrice extracellulare e le specie reattive dell'ossigeno (ROS) che incrementano la mutagenesi, la crescita e l'invasività tumorale (88,89).

È stato dimostrato che nel tumore polmonare, la stimolazione del TLR4 mediante LPS incrementa la produzione di citochine immunosoppressive, contribuendo così all'immuno-escape e determinando resistenza all'apoptosi (90).

È stato dimostrato anche l'incremento della proliferazione cellulare, in seguito ad attivazione del TLR4 da parte di *Helicobacter pylori*, nel tumore allo stomaco (91).

Alcuni studi riportano che l'inibizione di TLR2 e TLR4 rappresenta un trattamento efficace per le neoplasie mieloidi. I pazienti con sindrome mielodisplastica (MDS), una malattia delle cellule staminali ematopoietiche che può portare al cancro, presentano livelli di espressione aumentati di TLR2, e l'inibizione del TLR2 mediante l'anticorpo OPN-305 sembra avere un effetto positivo in tali pazienti (92).

CX-01, un inibitore sintetico di TLR2/4, è attualmente in sperimentazione clinica per la leucemia mieloide acuta (93).

## **OBIETTIVI DELLO STUDIO**

I dati presenti in letteratura evidenziano il ruolo fondamentale svolto da IGFBP-6 e ShH nei processi di proliferazione cellulare, di regolazione dell'apoptosi e di differenziamento. Lo studio condotto ha avuto l'obiettivo di indagare il ruolo di IGFBP-6 e ShH sullo stroma e sulla controparte tumorale al fine di valutare un loro possibile coinvolgimento nei meccanismi di resistenza ai farmaci. Diversi studi dimostrano che, alla base della resistenza farmacologica, una parte fondamentale è svolta dal sistema immunitario, quindi un ulteriore obiettivo è stato quello di comprendere il ruolo dei TLR e la sua connessione con IGFBP-6 e SHH.

## **MATERIALI E METODI**

### **Colture cellulari**

Le linee cellulari utilizzate per gli esperimenti sono le LAMA84-s (ATCC CRL-3347™) di leucemia mieloide cronica nella fase blastica e le HS-5 (ATCC CRL-11882™) cellule stromali sane provenienti dal midollo osseo.

Le LAMA-84 sono state coltivate in terreno RPMI 1640 in cui è stato aggiunto il 10% di FBS e l'1% di penicillina/streptomicina, invece le HS-5 sono state coltivate in terreno DMEM anche questo arricchito con FBS al 10% e penicillina/streptomicina all'1%. Entrambe le linee cellulari sono state incubate a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub>.

Gli esperimenti sono stati condotti sia sulle singole linee cellulari che su co-culture di cellule stromali e cellule di leucemia mieloide cronica.

## Saggio XTT

Il test dell'XTT (Sigma) è un saggio colorimetrico basato sulla riduzione del 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-Sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2Htetrazolium ydroxide) in formazano, un composto solubile in acqua di colore arancione direttamente quantificabile allo spettrofotometro. La riduzione del XTT avviene all'interno della cellula ed è operata da enzimi, pertanto richiede cellule metabolicamente attive. Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ( $2 \times 10^4$  cell/ml HS-5;  $1 \times 10^5$  cell/ml LAMA84) e trattate con Dasatinib alla concentrazione di 1nM per 48h sia sulle linee cellulari in monocultura che sulle co-culture, inoltre la vitalità cellulare è stata misurata anche dopo pretrattamento con IGFBP-6  $1\mu\text{M}$  per 24h e successivo trattamento con Dasatinib 1nM per ulteriori 48h. Alla fine dell'incubazione sono stati aggiunti 25  $\mu\text{l}$ /pozzetto di XTT ed incubati per 4h. In seguito, l'assorbanza è stata misurata a 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento) con un lettore di piastre Multiskan SkyHigh Microplate Specrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

## **Analisi Western blot**

L'analisi western blot è stata eseguita sulle HS-5, sulle LAMA-84 in monocultura e sulle singole linee cellulari che sono state in co-cultura tra loro. Le cellule sono state lisate in buffer fosfato salino freddo contenente l'1% di Triton X-100. Il contenuto proteico totale è stato quantizzato e una eguale quantità di proteine 50 µg per ogni campione è denaturato per 5 min nel buffer di Laemmli. La separazione delle proteine è stata eseguita mediante elettroforesi utilizzando un gel di poliacrilammide al 12% (Mini Protean II System, Bio-Rad, Herts, UK) seguita dall'elettro-trasferimento delle proteine sulla membrana di nitrocellulosa. Successivamente le membrane sono state bloccate usando Odyssey Blocking Buffer (Licor, Milan, Italy) per un'ora a temperatura ambiente. Dopo il blocco dei siti aspecifici, le membrane sono state lavate tre volte con buffer salino fosfato (PBS) per 5 minuti e incubate overnight a 4°C con i seguenti anticorpi primari risospesi in Odyssey Blocking Buffer: anti-IGFBP-6 (1:500, abcam), anti-β-Actina (1:5000, abcam), anti-αSMA (1:500, abcam), anti-FAP1 (1:500, abcam), anti-TGF-β (1:500, abcam), anti-TLR3 (1:500, abcam), anti-TLR4 (1:500, abcam). Dopo l'incubazione le membrane sono state lavate tre volte con PBS tween 0,1% per 5 minuti ed incubate successivamente con gli anticorpi secondari infrared anti-mouse (Alexa Fluor® 488) e anti-rabbit (Alexa Fluor® 620) risospesi in Odyssey Blocking Buffer per un'ora. Le bande sono state visualizzate usando lo strumento Odyssey Infrared Imaging Scanner (Licor, Milan, Italy) e i livelli di proteina sono stati quantificati mediante analisi densitometrica tramite il software ImageJ. I dati sono stati normalizzati sui livelli di espressione della β-actina.



## **Immunofluorescenza**

L'immunofluorescenza è stata eseguita su cellule precedentemente fissate in paraformaldeide al 4%, permeabilizzate con Triton 100X allo 0.1% e incubate nella soluzione di blocco (10% normal goat serum, NGS, allo 0.1% di Triton 100X in PBS) per un'ora a temperatura ambiente. I campioni sono stati incubati overnight a 4°C con i seguenti anticorpi diluiti in PBS: anti-IGFBP-6 (1:100, abcam), pNFkB (1:100, abcam), IRF3 (1:100, abcam), YAP1 (1:100, abcam), e GLI1 (1:100, abcam). Dopo l'incubazione i campioni sono stati lavati e incubati per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo fluorescente secondario specifico per ogni anticorpo primario utilizzato. I nuclei sono stati marcati con 4',6-diamidino-2-fenylindole (Dapi, 1:1000, Cat# D1306, Invitrogen) per 5 minuti a temperatura ambiente. I vetrini sono stati montati usando il montante fluorescente Permafluor (ThermoScientific) e le immagini digitali sono state acquisite mediante il microscopio a fluorescenza Leica DM IRB (Leica Microsystems, Buccinasco, Milano, Italy) o il microscopio confocale Leica TCS SP8.

## **Analisi mediante Real time PCR quantitativa**

L'RNA cellulare è stato estratto secondo protocollo Trizol (thermofisher scientific).

Il cDNA è stato sintetizzato retrotrascrivendo 1µg di RNA totale utilizzando il kit di retrotrascrizione Applied Biosystem (Foster City, CA, USA). Sono stati valutati i livelli di espressione di IGFBP-6, SIRT1, PGC1 $\alpha$ , TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ , ShH, TLR4. Per ogni campione, i livelli di espressione genica sono stati normalizzati utilizzando i livelli di espressione della  $\beta$ -actina.

## **Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata condotta usando il software GraphPad Prism 7.00. La significatività statistica ( $p < 0.05$ ) delle differenze tra i gruppi sperimentali è stata valutata mediante ANOVA nel caso di gruppi multipli e t-test nel caso di due gruppi. I dati sono presentati come  $\pm$  media e SD.

## RISULTATI

**Il Dasatinib non influenza la vitalità dello stroma e la co-coltura LAMA-84/HS5 conferisce resistenza alle LAMA-84 rendendo lo stroma glicolitico e pro-infiammatorio.**

Il Dasatinib è un inibitore delle tirosin chinasi che agisce a livello delle cellule di leucemia mieloide cronica. Al fine di valutare il suo effetto sulle HS-5, sulle LAMA-84 e sulle LAMA-84 che sono state in co-coltura con le HS-5 abbiamo condotto il saggio XTT dopo trattamento con Dasatinib alla concentrazione di 1nM per 48 ore.

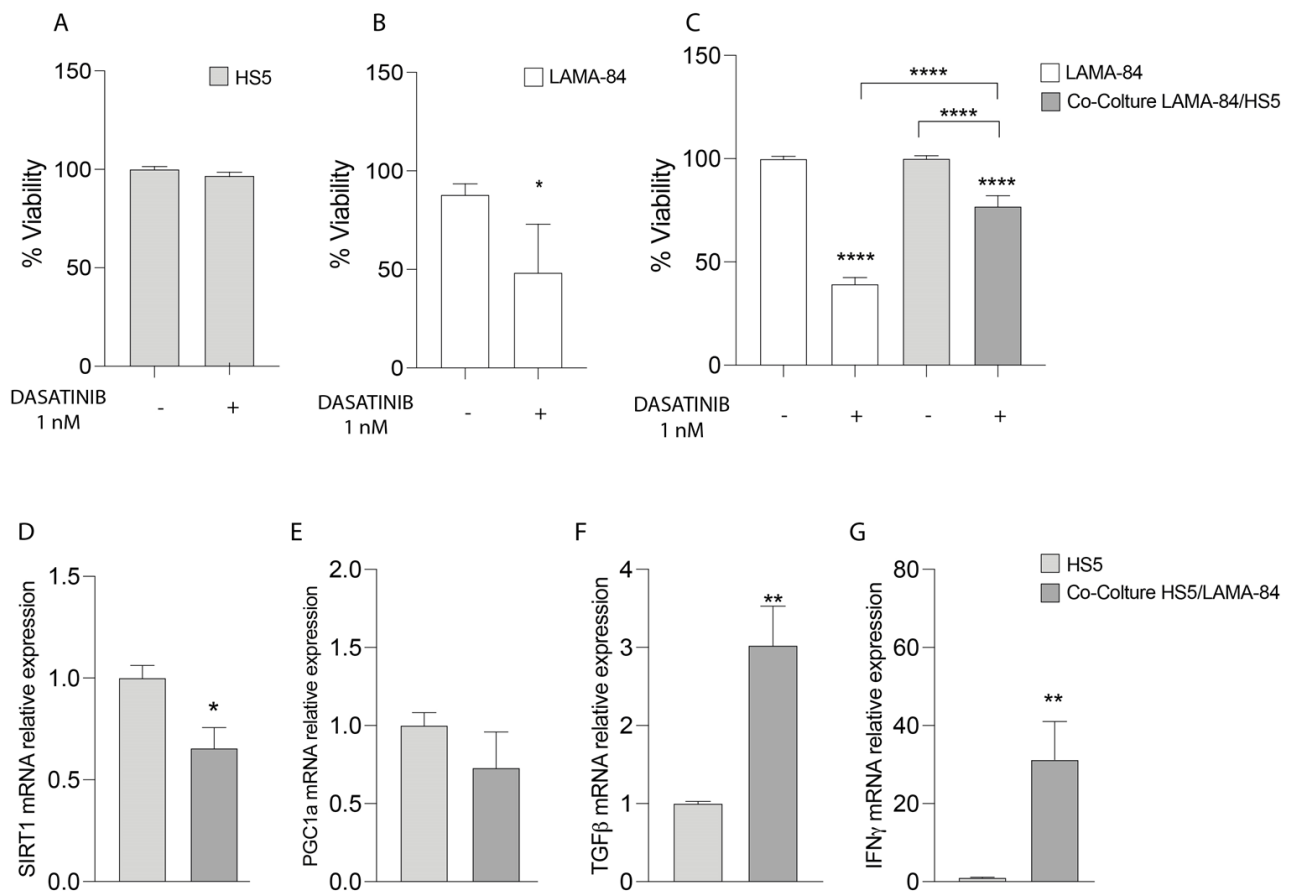
Il trattamento con Dasatinib non influenza la vitalità delle HS-5 (Figura 1A) e determina riduzione della vitalità cellulare delle LAMA-84 (Figura 1B).

L'XTT condotto sulle LAMA-84 che sono state in co-coltura con le HS-5 e trattate con Dasatinib mostra una riduzione della loro mortalità rispetto alle LAMA-84 in monocoltura (Figura 1C).

Al fine di valutare l'assetto metabolico e il fenotipo delle HS-5 poste in co-coltura con le LAMA-84, abbiamo misurato i livelli di espressione di SIRT1, PGC1 $\alpha$ , TGF $\beta$  e IFN $\gamma$ .

La downregolazione di SIRT1 associato con una tendenza in calo di PGC1 $\alpha$  (Figura 1D ed E) ci suggerisce una possibile diminuzione della biogenesi mitocondriale associata inoltre a possibile shift verso il metabolismo glicolitico.

Le cellule stromali che sono state in co-coltura mostrano livelli aumentati di TGF $\beta$  e IFN $\gamma$ , suggerendo che tali cellule stanno assumendo un fenotipo pro-infiammatorio (Figura 1F e G).



**Figura 1. Vitalità di HS5 (A), LAMA-84 (B) e LAMA-84 in co-coltura con HS5 (C) dopo trattamento con Dasatinib 1nM. Espressione relativa di SIRT-1 (D), PGC1 $\alpha$  (E), TGF $\beta$  (F) e IFN $\gamma$  (G) nelle HS5 in co-coltura con LAMA-84 rispetto alle HS5 in monocoltura. \*p<0,1;\*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001;\*\*\*\*p<0,0001.**

## **Il Dasatinib incrementa i livelli di IGFBP-6 nelle co-culture e il pre-trattamento con IGFBP-6 determina una minore mortalità delle LAMA-84 al Dasatinib.**

Il trattamento con il Dasatinib determina un aumento dei livelli di espressione del messaggero di IGFBP-6 sulle HS-5 che sono state in co-cultura con le LAMA-84 rispetto alle HS-5 in monocultura e alle HS-5 in co-cultura non trattate (Figura 2A).

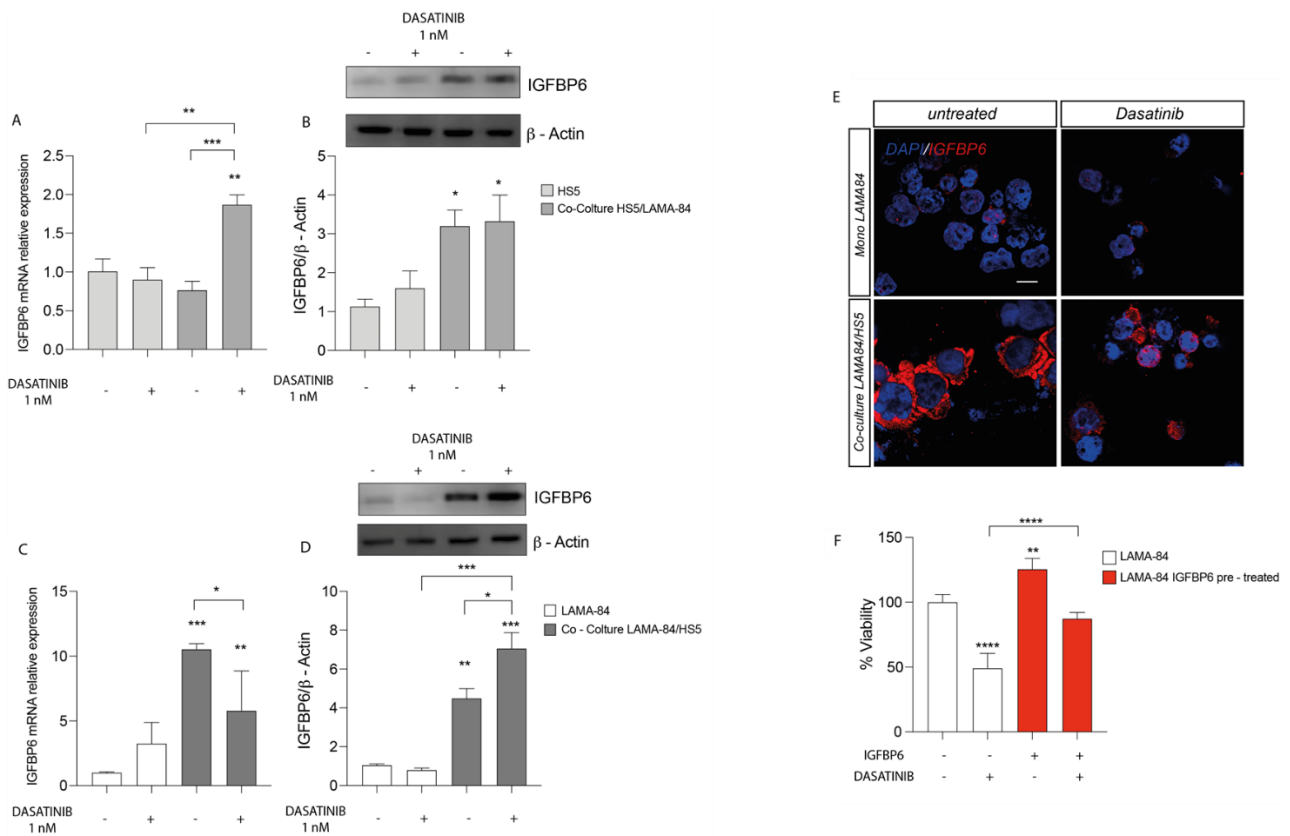
Inoltre, l'analisi Western Blot ha mostrato che i livelli di espressione della proteina IGFBP-6 aumentano nelle HS-5 che sono state in co-cultura con le LAMA-84 (Figura 2B).

In maniera analoga sono stati valutati i livelli di espressione del messaggero IGFBP-6 sulle LAMA-84 che risultano aumentati dopo co-cultura con le HS-5 (Figura 2C).

Anche l'analisi dei livelli di espressione della proteina IGFBP-6 ha mostrato un aumento, soprattutto nelle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5 e trattate con Dasatinib (Figura 2D).

L'immunofluorescenza dimostra che i livelli di IGFBP-6 nelle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5 sono più elevati rispetto alle LAMA-84 in monocultura indipendentemente dal trattamento con Dasatinib (Figura 2E).

Infine, è stata valutata la vitalità delle LAMA-84 dopo pre-trattamento con IGFBP-6 e successivo trattamento con Dasatinib. Tale analisi ha dimostrato che il pre-trattamento con IGFBP-6 riduce la mortalità delle LAMA-84 rispetto alle LAMA-84 trattate solamente con il Dasatinib (Figura 2F).



**Figura 2.** Espressione relativa del trascritto (A) e della proteina (B) di IGFBP6 nelle HS5 in co-cultura con le LAMA-84 rispetto alle HS5 in monocultura dopo trattamento con Dasatinib 1nM. Espressione relativa del trascritto di IGFBP6 (C) e della relativa proteina (D) nelle LAMA-84 in co-cultura con le HS5 rispetto alle LAMA-84 in monocultura dopo trattamento con Dasatinib 1nM. (E) Analisi in immunofluorescenza di IGFBP6 (IGFBP6 in rosso, nucleo in blu) nelle LAMA-84 in co-cultura con le HS5 rispetto alle LAMA-84 in monocultura dopo trattamento con Dasatinib. (F) Vitalità delle LAMA-84 pretrattate con IGFBP6 e successivo trattamento con Dasatinib 1nM rispetto alle LAMA-84 trattate con solo Dasatinib 1nM. \* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## **IGFBP-6 determina la trasformazione delle HS-5 in CAF.**

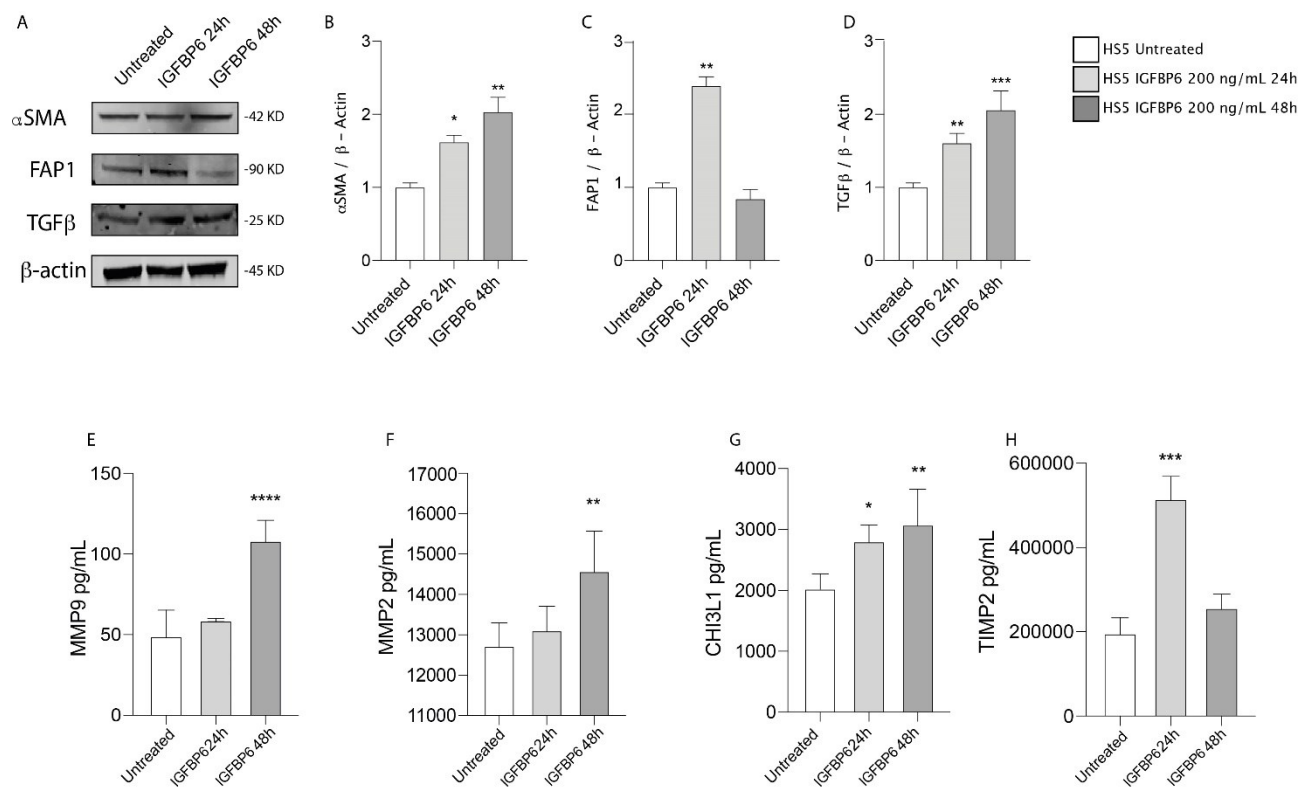
Per valutare l'effetto di IGFBP-6 sulle cellule stromali, le HS-5 sono state trattate con IGFBP-6 alla concentrazione di 1 $\mu$ M per 24 e 48h.

Tale trattamento determina un incremento dei livelli di espressione proteica di  $\alpha$  SMA, FAP1 e TGF $\beta$  (Figure 3 A, B, C, D) che sono molecole strettamente correlate al fenotipo CAF e infiammatorio.

Poiché l'acquisizione del fenotipo CAF è spesso associata a una modificazione dell'ambiente extracellulare, sono state valutate molecole strettamente coinvolte nella modificazione della matrice extracellulare come MMP9, MMP2, CHI3L1 e TIMP2.

Il trattamento con IGFBP-6 determina un incremento dei livelli di MMP9 MMP2 e CHI3L1 dopo 48h (Figure 3E, F, H). Inoltre, l'aumento significativo dei livelli dell'inibitore di MMP2, TIMP2, osservato a 24h e successiva diminuzione a 48h, concorda con l'andamento dei livelli di MMP2 (Figure 3F, 3H).



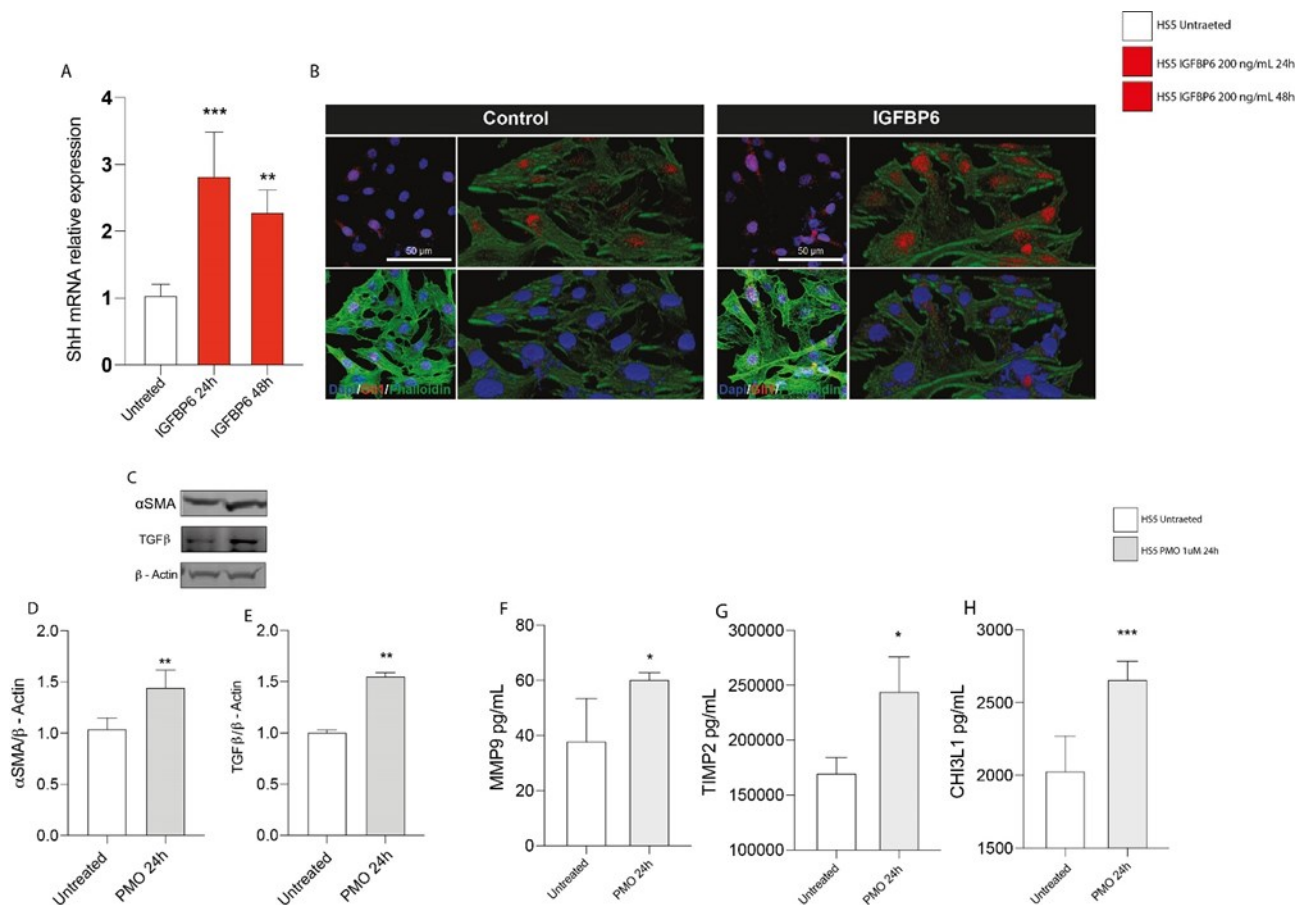


**Figura 3. Espressione relativa delle proteine αSMA, FAP1, TGFβ nelle HS5 dopo trattamento con IGFBP6 per 24 e 48h (A-D). Concentrazione assoluta (pg/ml) di MMP9, MMP2, CHI3L1, TIMP2 nel surnatante delle HS5 dopo trattamento con IGFBP6 per 24 e 48h (E-H). \*p<0,1; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.**

## **IGFBP-6 incrementa i livelli di espressione di ShH.**

Per valutare se IGFBP-6 modula la via di ShH, le cellule stromali sono state trattate con IGFBP-6 1  $\mu$ M per 24h e 48h. I livelli di espressione di ShH sono aumentati in seguito al trattamento delle HS-5 con IGFBP-6 (Figura 4A). Il dato è confermato dall'analisi in immunofluorescenza dove è stata dimostrato che Gli1, marcatore univoco di attivazione della via ShH, aumenta la sua espressione in seguito al trattamento con IGFBP-6 (Figura 4 B).

Per confermare che la via di attivazione fosse ShH e confermare che tale via è coinvolta nella trasformazione delle HS-5 in CAF con fenotipo infiammatorio, sono stati effettuati dei trattamenti con PMO 1  $\mu$ M per 24h, il quale è un agonista di ShH e sono stati valutati i livelli di espressione proteica di  $\alpha$ SMA e TGF $\beta$ . I livelli di espressione proteica di  $\alpha$ SMA e TGF $\beta$  sono aumentati dopo trattamento con PMO 1  $\mu$ M per 24h (Figura 4 C-E). Sono stati valutati anche i livelli di MMP9, CHI3L1 E TIMP2 che anche dopo trattamento con PMO risultano aumentati, suggerendo una modificazione della composizione della matrice extracellulare (Figura 4 F-H).



**Figura 4.** Espressione relativa del trascritto di ShH nelle HS5 dopo trattamento con IGFBP6 per 24 e 48h (A). Analisi in immunofluorescenza dell'espressione di Gli1 (in rosso) nelle HS5 dopo trattamento con IGFBP6 per 24 e 48h (B). Espressione relativa delle proteine αSMA e TGFβ nelle HS5 dopo trattamento con PMO per 24h (C-E). Concentrazione assoluta (pg/ml) di MMP9 (F), TIMP2 (G) e CHI3L1 (H), nel surnatante delle HS5 dopo trattamento con PMO per 24. \* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\*

## **Il pre-trattamento con IGFBP-6 incrementa i livelli di espressione di SHH nelle co-culture.**

Al fine di valutare se la combinazione del trattamento IGFBP-6 e Dasatinib, influenzasse il fenotipo delle HS-5, sono stati condotti dei trattamenti sulle HS-5 in monocultura e sulle HS-5 che sono state in co-cultura con le LAMA-84.

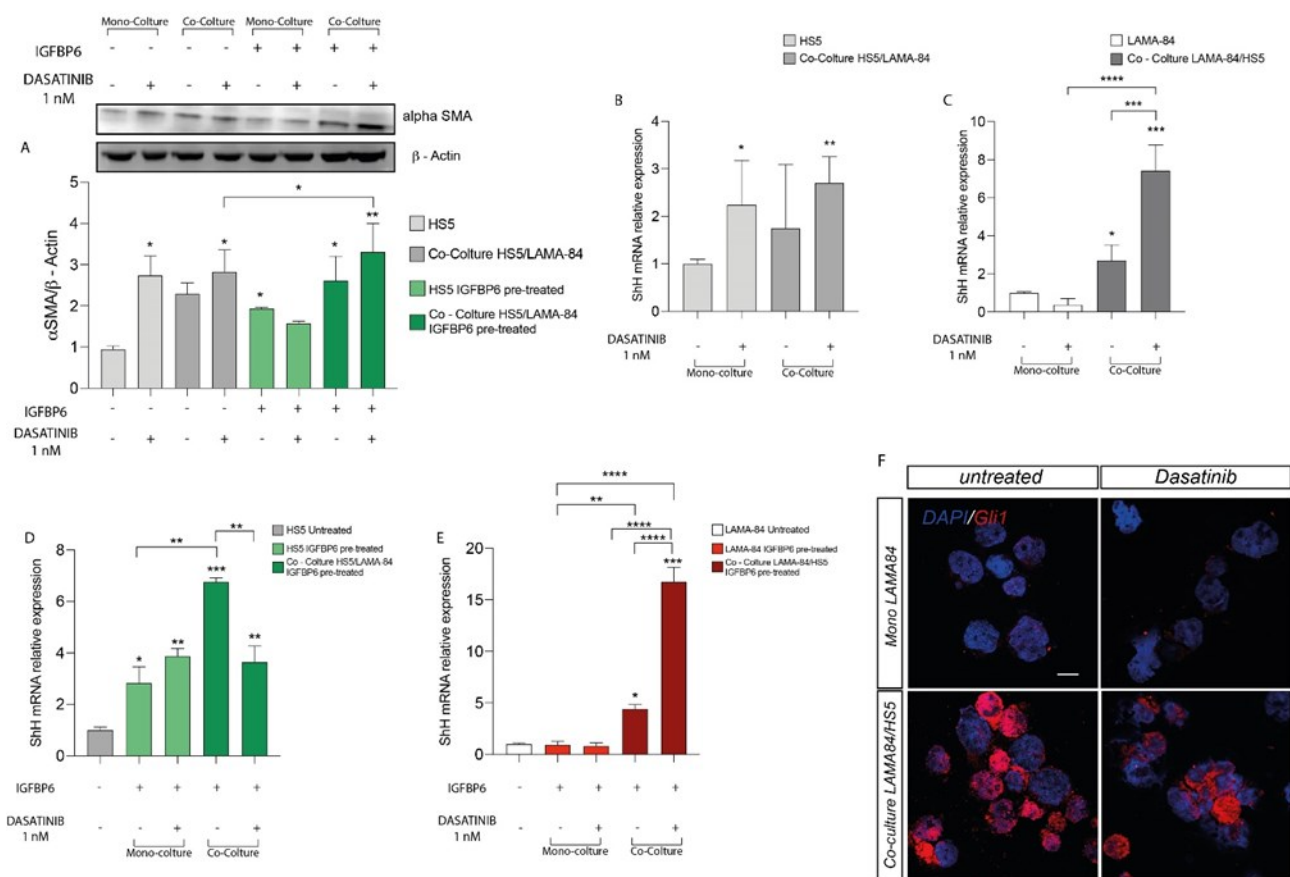
L'analisi western blot ha dimostrato che i livelli di espressione proteica di  $\alpha$  SMA sono aumentati nelle HS-5 sia in monocultura che in quelle che sono state in co-cultura con le LAMA-84 e trattate con Dasatinib. Inoltre, il pretrattamento con IGFBP-6 incrementa l'espressione di  $\alpha$ SMA soprattutto nelle HS-5 che sono state in co-cultura con le LAMA-84 e trattate con Dasatinib (Figura 5 A). Il Dasatinib determina un incremento di espressione dei livelli del messaggero di ShH nelle HS-5 sia in monocultura che nelle HS-5 che sono state in co-cultura con le LAMA-84 (Figura 5 B). I livelli di espressione del messaggero di SHH sono aumentati nelle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5 e soprattutto dopo trattamento con Dasatinib (Figura 5 C).

Al fine di valutare se la combinazione IGFBP-6 e Dasatinib avesse un effetto additivo sull'espressione di ShH, è stato effettuato un pretrattamento con IGFBP-6 sia sulle HS-5 e LAMA-84 in monocultura che sulle HS-5 che sono state in co-cultura con le LAMA-84 e sulle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5. Sulla parte stromale, il trattamento con IGFBP-6 determina un aumento dei livelli di espressione genica di ShH; soprattutto nelle HS-5 che sono state in co-cultura con le LAMA-84 (Figura 5D).

IGFBP-6 incrementa i livelli di espressione del messaggero di ShH nelle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5, soprattutto nelle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5 e trattate con Dasatinib (Figura 5E).

L'analisi in immunofluorescenza condotta dopo trattamento con Dasatinib delle LAMA-84 in monocultura e delle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5, ha permesso di confermare l'attivazione della via di ShH. Le LAMA-84 che sono state

in co-coltura con le HS-5 presentano livelli di Gli1 aumentati rispetto alle LAMA-84 in monocoltura (Figura 5 F).



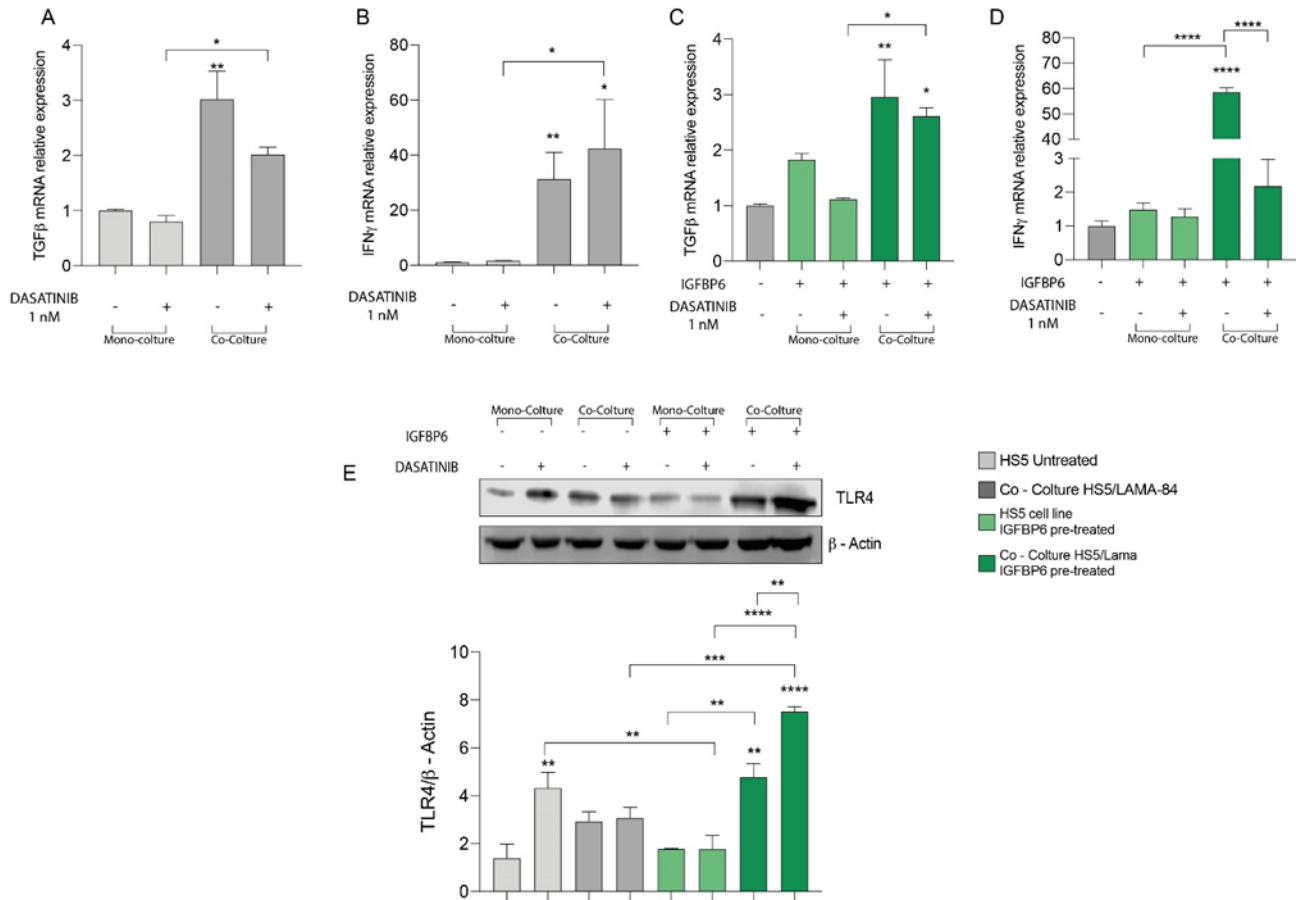
**Figura 5.** Espressione relativa della proteina  $\alpha$ SMA nelle HS5 in co-coltura con le LAMA-84 in presenza o meno di pretrattamento con IGFBP6 rispetto alle HS5 in monocoltura in presenza o meno di pretrattamento con IGFBP6 (A). Espressione relativa del trascritto di ShH nelle HS5 (B) e nelle LAMA-84 (C) in co-coltura, in presenza o meno di Dasatinib 1nM. Espressione relativa del trascritto di ShH nelle HS5 (D) e nelle LAMA-84 (E) in co-coltura, in presenza o meno di IGFBP6 e Dasatinib 1nM. Analisi in immunofluorescenza dell'espressione di Gli1 nelle LAMA-84 in co-coltura con le HS5 in presenza o meno di Dasatinib 1nM (F). \* $p<0,1$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\*

## **Il trattamento combinato IGFBP-6/Dasatinib incrementa lo stato infiammatorio delle HS-5 e attiva il TLR4.**

Per valutare l'effetto del Dasatinib e della combinazione IGFBP-6/Dasatinib sullo stato infiammatorio dello stroma, sono stati valutati i livelli di espressione del messaggero di TGF $\beta$  e IFN $\gamma$ . Le HS-5 in monocultura e le HS-5 in co-cultura con le LAMA-84 sono state trattate con Dasatinib 1nM per 48h. La co-cultura determina un incremento dei livelli di espressione del messaggero di TGF $\beta$  e IFN $\gamma$  (Figura 6 A-B).

Inoltre, il pretrattamento con IGFBP-6 delle HS-5 che sono state in co-cultura con le LAMA-84 determina un incremento dei livelli di espressione del messaggero di TGF $\beta$  e IFN $\gamma$  rispetto alle HS-5 in monocultura che hanno subito lo stesso trattamento (Figura 6 C-D).

Il pretrattamento con IGFBP-6 e successivo trattamento con Dasatinib delle HS-5 che sono state in co-cultura con le LAMA-84, determina un incremento dei livelli della proteina TLR4 rispetto alle HS-5 che sono state in co-cultura e trattate solamente con IGFBP-6. Inoltre, le HS-5 che sono state in co-cultura con le LAMA-84 presentano livelli di espressione della proteina TLR4 aumentati rispetto sia alla monocultura che ha ricevuto lo stesso trattamento, sia rispetto alle HS-5 che sono state in co-cultura con le LAMA-84 e che non sono state pretrattate con IGFBP-6. I livelli di espressione di TLR4 risultano diminuiti nella monocultura delle HS-5 pretrattate con IGFBP-6 e successivamente con Dasatinib, rispetto alle HS-5 in monocultura trattate solamente con Dasatinib (Figura 6 E).



**Figura 6.** Espressione relativa del trascritto di TGFβ (A) e INFγ (B) nelle HS5 in co-cultura con le LAMA-84, in presenza o meno di Dasatinib 1nM. Espressione relativa del trascritto di TGFβ (C) e INFγ (D) nelle HS5 in co-cultura con le LAMA-84, in presenza o meno di IGFBP6 e Dasatinib 1nM. Espressione relativa della proteina TLR4 nelle HS5 in monocultura e in co-cultura con le LAMA-84, in presenza o meno di IGFBP6 e Dasatinib 1nM (E). \*p<0,1; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.



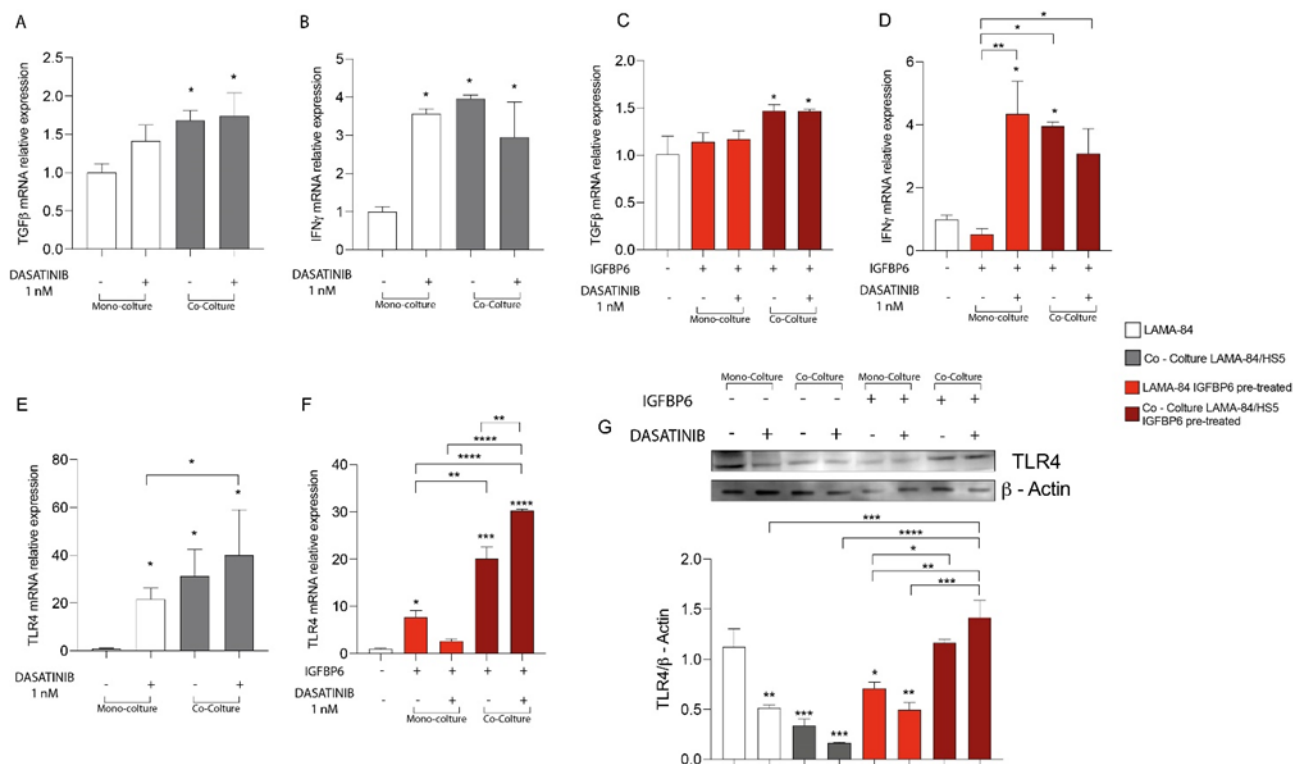
## **Il trattamento combinato IGFBP-6/Dasatinib incrementa lo stato infiammatorio delle LAMA-84 e attiva il TLR4.**

Per valutare se il Dasatinib possa condizionare anche lo stato infiammatorio della controparte tumorale, così come osservato sulle HS-5, la monocultura LAMA-84 e la co-cultura LAMA-84/ HS-5 sono state trattate con Dasatinib 1nM per 48h. Dopo il trattamento, sono stati valutati i livelli di espressione del messaggero di TGF $\beta$  e IFN $\gamma$  sia sulle LAMA-84 in monocultura che sulle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5. I livelli di TGF $\beta$  aumentano nelle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5, mentre i livelli di IFN $\gamma$  aumentano sia nelle LAMA-84 in monocultura dopo trattamento con Dasatinib e nelle LAMA-84, sia trattate che non trattate con Dasatinib, che sono state in co-cultura con le HS-5 (Figura 7 A-B). I livelli di TGF $\beta$  risultano aumentati anche nelle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5 e pretrattate con IGFBP-6 rispetto alla monocultura delle LAMA-84 che ha ricevuto lo stesso trattamento (Figura 7 C). Inoltre, il trattamento combinato IGFBP-6/Dasatinib determina un considerevole aumento dei livelli di IFN $\gamma$  sulle LAMA-84 in monocultura rispetto alle LAMA-84 in monocultura trattate solamente con IGFBP-6. Le LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5 sia pretrattate solamente con IGFBP-6 che con la combinazione IGFBP-6/Dasatinib, mostrano livelli aumentati di IFN $\gamma$  rispetto alla monocultura trattata solamente con IGFBP-6 (Figura 7 D).

Inoltre, i livelli di espressione del messaggero TLR4 sono aumentati nelle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5 e che sono state trattate con Dasatinib rispetto sia alle LAMA-84 in monocultura trattate con Dasatinib sia alle LAMA-84 non trattate e che sono state in co-cultura (Figura 7 E).

La co-cultura, il pretrattamento con IGFBP-6 ed il successivo trattamento con Dasatinib determinano un aumento dei livelli di espressione di TLR4 rispetto alle LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5 e trattate solamente con IGFBP-6. I livelli di TLR4 aumentano anche nelle LAMA-84 in monocultura pretrattate con IGFBP-6. (Figura 7 F). Le LAMA-84 che sono state in co-cultura con le HS-5 e sono

state trattate con IGFBP-6 o con la combinazione IGFBP-6/Dasatinib, mostrano livelli di proteina aumentati rispetto alla monocultura con lo stesso trattamento (Figura 7 G).



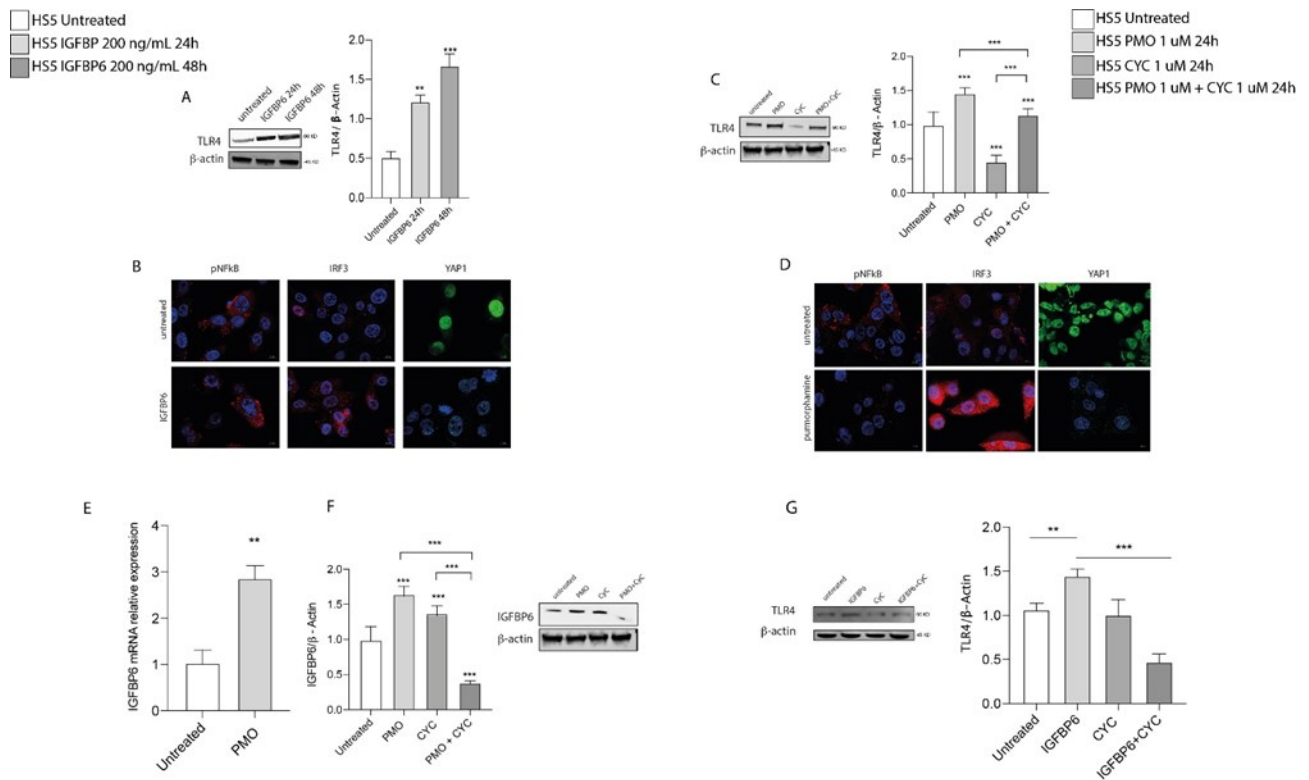
**Figura 7.** Espressione relativa del trascritto di TGFβ (A) e INFγ (B) nelle LAMA-84 in co-coltura con le HS5, in presenza o meno di Dasatinib 1nM. Espressione relativa del trascritto di TGFβ (C) e INFγ (D) nelle LAMA-84 in co-coltura con le HS5, in presenza o meno di IGFBP6 e Dasatinib 1nM. Espressione relativa del trascritto di TLR4 nelle LAMA-84 in co-coltura con le HS5, in presenza o meno di Dasatinib 1nM (E). Espressione relativa del trascritto di TLR4 nelle LAMA-84 in co-coltura con le HS5, in presenza o meno di IGFBP6 e Dasatinib 1nM (F). Espressione relativa della proteina TLR4 nelle LAMA-84 in monocoltura e in co-coltura con le HS5, in presenza o meno di IGFBP6 e Dasatinib 1nM (G). \*p<0,1;\*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001;\*\*\*\*

## **IGFBP-6 e SHH sono correlati tra loro ed entrambi modulano la via del TLR4.**

Per valutare se IGFBP-6 e ShH fossero correlati tra loro ed entrambi siano coinvolti nella via di attivazione del TLR4 nello stroma, le HS-5 sono state trattate con IGFBP-6 1 $\mu$ M per 24h e 48h. Questo trattamento determina un incremento nei livelli di espressione proteica del TLR4 (Figura 8 A). Per confermare l'attivazione della via, è stata condotta un'analisi in immunofluorescenza dove sono stati misurati pNF-kB, IRF3 e YAP1, i quali sono molecole effettrici di tale via (Figura 8 B).

Per comprendere se anche ShH fosse in grado di attivare la via del TLR4, le HS-5 sono state trattate con PMO, CYC e la combinazione di entrambe le molecole. I dati dimostrano che il trattamento con PMO incrementa i livelli della proteina TLR, la CYC li riduce, mentre la combinazione di entrambe le molecole ha un effetto ridotto rispetto al solo trattamento con PMO (Figura 8 C). Anche in questo caso, la conferma dell'attivazione della via TLR4 da parte di PMO, si ha dall'analisi in immunofluorescenza che dimostra la modulazione di pNF-kB, IRF3 e YAP1 (Figura 8 D).

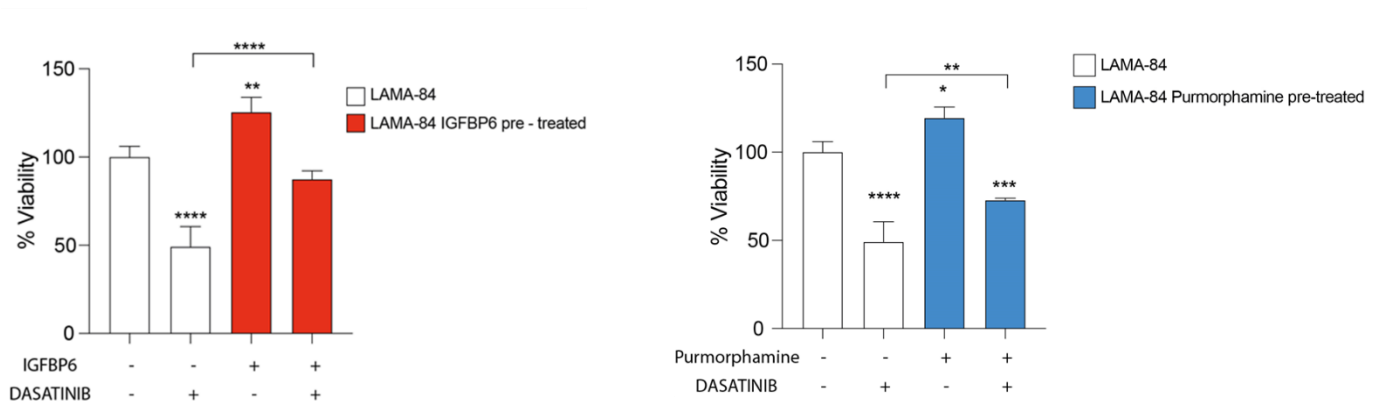
La correlazione tra IGFBP-6 e SHH è stata dimostrata trattando le HS-5 con PMO e valutando la modulazione di IGFBP-6. Il trattamento con PMO determina un incremento dei livelli di espressione del messaggero di IGFBP-6. Inoltre, il trattamento con PMO, CYC e la combinazione delle due molecole ha permesso di dimostrare che i livelli di espressione della proteina IGFBP-6 aumentano in seguito al trattamento con PMO, si riducono in seguito al trattamento con CYC e il trattamento con la combinazione PMO CYC ne determina una riduzione ancora più marcata (Figura 8 E). Considerato che sia IGFBP-6 che PMO determinano una modulazione di TLR4, per dimostrare che le tre vie sono collegate, le HS-5 sono state trattate con IGFBP-6, CYC e con la combinazione IGFBP-6/CYC. Tale trattamento ha dimostrato che la modulazione del TLR4 segue lo stesso andamento della modulazione di IGFBP-6 dopo trattamento con PMO, CYC e la combinazione PMO/CYC (Figura 8 F).



**Figura 8.** Espressione relativa della proteina di TLR4 nelle HS5 dopo trattamento con IGFBP6 per 24 e 48h (A). Analisi in immunofluorescenza dell'espressione di p-NFkb, IRF3 e YAP1 nelle HS5 dopo trattamento con IGFBP6 (B). Espressione relativa della proteina di TLR4 nelle HS5 dopo trattamento con PMO, CYC e PMO/CYC (C). Analisi in immunofluorescenza dell'espressione di p-NFkb, IRF3 e YAP1 nelle HS5 dopo trattamento con PMO (D). Espressione relativa del trascritto di IGFBP6 nelle HS5 dopo trattamento con PMO (E). Espressione relativa della proteina di IGFBP6 nelle HS5 dopo trattamento con PMO, CYC e PMO/CYC (F). Espressione relativa della proteina di TLR4 nelle HS5 dopo trattamento con IGFBP6, CYC e IGFBP6/CYC (G). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\*

## IGFBP-6 e PMO determinano una riduzione della mortalità delle LAMA-84 trattate con Dasatinib.

È stato valutato l'effetto di IGFBP-6 e di PMO sulla vitalità cellulare delle LAMA-84, sia trattate che non trattate con Dasatinib. Le LAMA-84 pretrattate con IGFBP-6 e successivamente con Dasatinib, mostrano una riduzione della mortalità rispetto alle LAMA-84 trattate solamente con Dasatinib. Anche il pretrattamento delle LAMA-84 con PMO e successivo trattamento con Dasatinib, ha mostrato lo stesso andamento sulla mortalità cellulare (Figura 9).



**Figura 9. Vitalità delle LAMA-84 dopo pretrattamento con IGFBP6 (A) e PMO (B).**  
 \* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\*

## DISCUSSIONE

Il microambiente del midollo osseo è costituito da molti tipi cellulari incluse le cellule mesenchimali stromali, osteoblasti, osteoclasti, cellule endoteliali e cellule neurali che interagiscono con le cellule staminali ematopoietiche sane attraverso diversi meccanismi (94-96).

Come riportato da precedenti studi, (97) la resistenza ai farmaci e la progressione della malattia sono profondamente legate al microambiente tumorale e in particolar modo allo stroma.

I primi esperimenti condotti, infatti, hanno dimostrato che le HS-5 non risentono del trattamento con Dasatinib, a differenza delle LAMA-84 che si manifestano sensibili al trattamento in monocultura ma non in co-cultura con le HS-5, confermando che lo stroma gioca un ruolo chiave nella resistenza al Dasatinib nella LMC.

Il cross-talk tra le cellule stromali di LMC e il microambiente è mediato da diverse molecole ad azione sia autocrina che paracrina.

Tra le molecole che possiedono questa attività, un ruolo fondamentale nei processi tumorali è svolto dalle IGFBP. Diversi studi hanno dimostrato che le IGFBP possono legarsi a recettori e attivare vie di segnalazione che modulano diversi processi cellulari (98).

I dati ottenuti hanno dimostrato che la co-cultura determina un incremento dei livelli di espressione di IGFBP-6 sia sulle HS-5 che sulle LAMA-84.

Le LAMA-84 trattate sia con IGFBP-6 che con Dasatinib presentano una mortalità inferiore rispetto alle LAMA-84 trattate solamente con il Dasatinib; tale dato suggerisce che IGFBP-6 potrebbe essere coinvolto nei meccanismi di resistenza.

La progressione di vari tipi di tumore e la resistenza alla terapia è associata al ruolo delle CAF, le quali agiscono mediante la secrezione di fattori solubili nella matrice extracellulare, interazioni fisiche con le cellule tumorali e regolazione dell'angiogenesi, dell'immunità e del metabolismo. Il trattamento con IGFBP-6 determina nelle HS-5 l'instaurarsi di un fenotipo CAF pro-infiammatorio come

dimostrato dall'incremento dei livelli proteici di  $\alpha$ SMA, FAP1 e TGF $\beta$ e di MMP9, MMP2, CHI3L1 e TIMP2 rilasciati nell'ambiente extracellulare.

Recentemente, la via di segnalazione di Hedgehog è stata riconosciuta come un'importante fattore che promuove la crescita tumorale e per tale motivo è ampiamente riconosciuta come target terapeutico (99). Nei Mammiferi, i fattori di trascrizione della cascata del segnale di Hedgehog, antigeni associati al glioma (Gli), hanno tre omologhi, Gli1, Gli2 e Gli3; e sulla base dell'identificazione dei geni target di Gli1 è stato possibile capire il coinvolgimento di questo gene nei processi di proliferazione, apoptosi, adesione cellulare, potenziale metastatico e angiogenesi (64, 100, 101). Dalla letteratura è noto che le cellule di LMC hanno elevati livelli di mRNA codificante per proteine coinvolte nella via di Hedgehog per cui è sospettabile un loro possibile coinvolgimento nello sviluppo della leucemia (102). L'inibizione di SMO non ha effetto sulle cellule staminali ematopoietiche normali ma inibisce le cellule staminali leucemiche, inoltre, l'esposizione delle cellule staminali leucemiche di LMC alla CYC ne riduce il numero e ne inibisce la crescita (103-105).

Gli esperimenti condotti hanno permesso di dimostrare che IGFBP-6 determina l'attivazione di SHH nelle HS-5 e tale attivazione è confermata dall'aumento dei livelli di Gli1 dimostrata mediante immunofluorescenza.

Così come IGFBP-6, anche SHH nelle HS-5 determina un incremento dei livelli di proteina  $\alpha$ SMA e TGF $\beta$ e il rilascio nell'ambiente extracellulare di MMP9, CHI3L1 e TIMP2, confermando che entrambe le molecole sono coinvolte nei processi di trasformazione delle cellule stromali in CAF con fenotipo pro-infiammatorio.

I dati ottenuti fino ad ora, hanno permesso di affermare che sia IGFBP-6 che SHH determinano la trasformazione delle HS-5 in CAF, e che associando il Dasatinib a IGFBP-6 i livelli di  $\alpha$ SMA nella co-coltura incrementano ma tale aumento è ancora più marcato nelle HS-5 che sono state in co-coltura e pretrattate con IGFBP-6, suggerendo che quest'ultimo contribuisce in maniera sostanziale all'attivazione del fenotipo CAF. Inoltre, la co-coltura e il Dasatinib determinano un incremento dei livelli di SHH nelle HS-5, ma il dato interessante è che, indipendentemente dal trattamento con Dasatinib,



le HS-5 che sono state in co-coltura e trattate con IGFBP-6 mostrano livelli estremamente elevati di ShH suggerendo che queste due vie sono intimamente connesse tra loro. Anche nelle LAMA-84 che sono state in co-coltura, si ha un incremento dei livelli di ShH in seguito al trattamento con Dasatinib e tale aumento è maggiormente significativo nel pretrattamento con IGFBP-6 e successivo trattamento con Dasatinib.

La co-coltura, anche in assenza di trattamento, incrementa lo stato infiammatorio, il quale contribuisce al mantenimento dell'ambiente ottimale per la progressione tumorale. L'infiammazione è uno dei fattori coinvolti nel processo di tumorigenesi, e il TLR4 rappresenta il pathway più studiato, infatti, diversi studi hanno dimostrato che l'attivazione del TLR4 incrementa i livelli di IL8 e IL6 nel tumore al seno, aumenta l'espressione di VEGF e TGF $\beta$  nel cancro alla prostata e molto spesso l'aumento dei suoi livelli di espressione è associata a una prognosi sfavorevole (106).

Lo studio condotto ha permesso di dimostrare che la co-coltura e il Dasatinib determinano un incremento dello stato infiammatorio sia delle HS-5 che delle LAMA-84, dimostrato dall'incremento dei livelli di TGF $\beta$  e IFN $\gamma$  e che tale aumento si intensifica quando le cellule vengono pretrattate con IGFBP-6 suggerendo che IGFBP-6 conferisce resistenza attraverso l'attivazione di processi infiammatori confermati dalla modulazione del TLR4 sia nelle HS-5 che nelle LAMA-84 dopo trattamento con IGFBP-6 e Dasatinib.

La medesima modulazione del TLR4 è stata osservata dopo trattamento delle HS-5 con PMO, CYC e la combinazione PMO/CYC, suggerendo che anche SHH risulta essere un diretto modulatore di TLR4. I dati dimostrano inoltre, che il trattamento delle HS-5 con PMO induce un aumento significativo di IGFBP6, e a sua volta l'aumento di SHH nelle HS-5 si verifica in seguito al trattamento con IGFBP-6, come visto negli esperimenti precedenti, dimostrando che le due vie sono interconnesse tra loro.

L'ulteriore conferma della connessione tra IGFBP-6 e ShH e del loro ruolo nella modulazione di TLR4 è data dall'andamento dei livelli di espressione proteica di TLR4 in seguito al trattamento con IGFBP-6, CYC e la combinazione IGFBP-6/CYC. Il

trattamento delle HS-5 con PMO, CYC e PMO/CYC o con IGFBP-6, CYC e IGFBP-6/CYC, infatti, determina un andamento simile nella modulazione del TLR4.

Infine, in seguito al pretrattamento con IGFBP-6 e/o PMO, si ha una ridotta mortalità delle LAMA-84 al Dasatinib rispetto al trattamento con il solo Dasatinib suggerendo che sia IGFBP-6 che ShH sono coinvolti nei meccanismi di resistenza che si instaurano in seguito alla modulazione del TLR4.

In conclusione, le pathways di IGFBP-6 e ShH possono essere considerate come possibili target di nuovi farmaci chemioterapici in grado di superare la resistenza alle attuali terapie sebbene i meccanismi alla base di tale resistenza siano poco chiari e richiedano ulteriori indagini.

## BIBLIOGRAFIA

1\_Chereda B, Melo JV. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol*. 2015 Apr;94 Suppl 2:S107-21. doi: 10.1007/s00277-015-2325-z. Epub 2015 Mar 27. PMID: 25814077.

2\_Dong Y, Shi O, Zeng Q, Lu X, Wang W, Li Y, Wang Q. Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Exp Hematol Oncol*. 2020 Jun 19;9:14. doi: 10.1186/s40164-020-00170-6. PMID: 32577323; PMCID: PMC7304189.

3\_Jabbour, E, Kantarjian, H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2020; 95: 691- 709. <https://doi.org/10.1002/ajh.25792>

4\_Hehlmann, Rüdiger Chronic Myeloid Leukemia in 2020, *HemaSphere*: October 2020 - Volume 4 - Issue 5 - p e468 doi: 10.1097/HS9.0000000000000468

5\_Pane F, Intrieri M, Quintarelli C, Izzo B, Muccioli GC, Salvatore F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene*. 2002 Dec 9;21(56):8652-67. doi: 10.1038/sj.onc.1206094. PMID: 12476311.

6\_Reckel S, Hantschel O. Bcr-Abl: one kinase, two isoforms, two diseases. *Oncotarget*. 2017 Sep 14;8(45):78257-78258. doi: 10.18632/oncotarget.20874. PMID: 29108223; PMCID: PMC5667957.

7\_Seminars in Immunology Volume 7, Issue 4, August 1995, Pages 255-266 Abl tyrosine protein kinase Author links open overlay panel PierreLaneuville <https://doi.org/10.1006/smim.1995.0030>

8\_Zhao X, Ghaffari S, Lodish H, Malashkevich VN, Kim PS. Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nat Struct Biol*. 2002 Feb;9(2):117-20. doi: 10.1038/nsb747. PMID: 11780146.

9\_Melo JV, Deininger MW. Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2004 Jun;18(3):545-68, vii-viii. doi: 10.1016/j.hoc.2004.03.008. PMID: 15271392.

10\_Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell*. 1991 Jul 12;66(1):161-71. doi: 10.1016/0092-8674(91)90148-r. PMID: 1712671.

11\_Zhang X, Subrahmanyam R, Wong R, Gross AW, Ren R. The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb;21(3):840-53. doi: 10.1128/MCB.21.3.840-853.2001. PMID: 11154271; PMCID: PMC86675.

- 12\_Cortez D, Reuther G, Pendergast AM. The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene*. 1997 Nov 6;15(19):2333-42. doi: 10.1038/sj.onc.1201400. PMID: 9393877.
- 13\_Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2005 Mar;5(3):172-83. doi: 10.1038/nrc1567. PMID: 15719031
- 14\_Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, Gesbert F, Iwasaki H, Li S, Van Etten RA, Gu H, Griffin JD, Neel BG. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell*. 2002 Jun;1(5):479-92. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00074-0. PMID: 12124177.
- 15\_Yilmaz O, Jungas T, Verbeke P, Ojcius DM. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2004 Jul;72(7):3743-51. doi: 10.1128/IAI.72.7.3743-3751.2004. PMID: 15213114; PMCID: PMC427421.
- 16\_Ren SY, Bolton E, Mohi MG, Morrione A, Neel BG, Skorski T. Phosphatidylinositol 3-kinase p85{alpha} subunit-dependent interaction with BCR/ABL-related fusion tyrosine kinases: molecular mechanisms and biological consequences. *Mol Cell Biol*. 2005 Sep;25(18):8001-8. doi: 10.1128/MCB.25.18.8001-8008.2005. PMID: 16135792; PMCID: PMC1234343.
- 17\_Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997 Feb 21;88(4):435-7. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81883-8. PMID: 9038334
- 18\_Illaria RL Jr, Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem*. 1996 Dec 6;271(49):31704-10. doi: 10.1074/jbc.271.49.31704. PMID: 8940193.
- 19\_Carlesso N, Frank DA, Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3):811-20. doi: 10.1084/jem.183.3.811. PMID: 8642285; PMCID: PMC2192351.
- 20\_Cilloni D, Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res*. 2012 Feb 15;18(4):930-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1613. Epub 2011 Dec 8. PMID: 22156549.
- 21\_Advani AS, Pendergast AM. Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects. *Leuk Res*. 2002 Aug;26(8):713-20. doi: 10.1016/s0145-2126(01)00197-7. PMID: 12191565
- 22\_Bhatia R. Novel approaches to therapy in CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017 Dec 8;2017(1):115-120. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.115. PMID: 29222245; PMCID: PMC6142563.
- 23\_Zhou H, Xu R. Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell*. 2015 Jun;6(6):403-12. doi: 10.1007/s13238-015-0143-7. Epub 2015 Mar 10. PMID: 25749979; PMCID: PMC4444810.

- 24\_Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y, Hu G, Sun Y. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.* 2015 Mar 5;13:45. doi: 10.1186/s12916-015-0278-7. PMID:
- 25\_Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.
- 26\_Tahmasebi Birgani M, Carloni V. Tumor Microenvironment, a Paradigm in Hepatocellular Carcinoma Progression and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 14;18(2):405. doi: 10.3390/ijms18020405. PMID: 28216578; PMCID: PMC5343939.
- 27\_Catalano V, Turdo A, Di Franco S, Dieli F, Todaro M, Stassi G. Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay. *Semin Cancer Biol.* 2013 Dec;23(6 Pt B):522-32. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.08.007. Epub 2013 Sep 4. PMID: 24012661.
- 28\_Sormendi S, Wielockx B. Hypoxia Pathway Proteins As Central Mediators of Metabolism in the Tumor Cells and Their Microenvironment. *Front Immunol.* 2018 Jan 29;9:40. doi: 10.3389/fimmu.2018.00040. PMID: 29434587; PMCID: PMC5796897.
- 29\_Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):883-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025. PMID: 20303878; PMCID: PMC2866629.
- 30\_Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018 Jun;22(12):3855-3864. doi: 10.26355/eurrev\_201806\_15270. PMID: 29949179.
- 31\_Mantovani A. The inflammation - cancer connection. *FEBS J.* 2018 Feb;285(4):638-640. doi: 10.1111/febs.14395. PMID: 29479848; PMCID: PMC5935239.
- 32\_Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, Clark CE, Rhim AD, Stanger BZ, Vonderheide RH. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer Cell.* 2012 Jun 12;21(6):822-35. doi: 10.1016/j.ccr.2012.04.025. PMID: 22698406; PMCID: PMC3575028.
- 33\_Motz GT, Coukos G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat Rev Immunol.* 2011 Sep 23;11(10):702-11. doi: 10.1038/nri3064. PMID: 21941296.
- 34\_Kramann R, Schneider RK. The identification of fibrosis-driving myofibroblast precursors reveals new therapeutic avenues in myelofibrosis. *Blood.* 2018 May 10;131(19):2111-2119. doi: 10.1182/blood-2018-02-834820. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29572380.
- 35\_Gleitz HF, Kramann R, Schneider RK. Understanding deregulated cellular and molecular dynamics in the haematopoietic stem cell niche to develop novel therapeutics for bone marrow fibrosis. *J Pathol.* 2018 Jun;245(2):138-

146. doi: 10.1002/path.5078. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29570794; PMCID: PMC5969225.

36\_Lucas D. The Bone Marrow Microenvironment for Hematopoietic Stem Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1041:5-18. doi: 10.1007/978-3-319-69194-7\_2. PMID: 29204826.

37\_Leimkühler NB, Schneider RK. Inflammatory bone marrow microenvironment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2019 Dec 6;2019(1):294-302. doi: 10.1182/hematology.2019000045. PMID: 31808897; PMCID: PMC6913454.

38\_Mukaida N, Tanabe Y, Baba T. Chemokines as a Conductor of Bone Marrow Microenvironment in Chronic Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 22;18(8):1824. doi: 10.3390/ijms18081824. PMID: 28829353; PMCID: PMC5578209.

39\_Houshmand M, Simonetti G, Circosta P, Gaidano V, Cignetti A, Martinelli G, Saglio G, Gale RP. Chronic myeloid leukemia stem cells. *Leukemia.* 2019 Jul;33(7):1543-1556. doi: 10.1038/s41375-019-0490-0. Epub 2019 May 24. PMID: 31127148; PMCID: PMC6755964.

40\_Bhatia R. Novel approaches to therapy in CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017 Dec 8;2017(1):115-120. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.115. PMID: 29222245; PMCID: PMC6142563.

41\_Osher E, Macaulay VM. Therapeutic Targeting of the IGF Axis. *Cells.* 2019 Aug 14;8(8):895. doi: 10.3390/cells8080895. PMID: 31416218; PMCID: PMC6721736.

43\_Zhang D, Samani AA, Brodt P. The role of the IGF-I receptor in the regulation of matrix metalloproteinases, tumor invasion and metastasis. *Horm Metab Res.* 2003 Nov-Dec;35(11-12):802-8. doi: 10.1055/s-2004-814143. PMID: 14710361.

44\_Brodt P, Fallavollita L, Khatib AM, Samani AA, Zhang D. Cooperative regulation of the invasive and metastatic phenotypes by different domains of the type I insulin-like growth factor receptor beta subunit. *J Biol Chem.* 2001 Sep 7;276(36):33608-15. doi: 10.1074/jbc.M102754200. Epub 2001 Jul 9. PMID: 11445567.

45\_Takeuchi K, Ito F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(12):1774-80. doi: 10.1248/bpb.34.1774. PMID: 22130229.

46\_Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, Martincorena I, Alexandrov LB, Martin S, Wedge DC, Van Loo P, Ju YS, Smid M, Brinkman AB, Morganello S, Aure MR, Lingjærde OC, Langerød A, Ringnér M, Ahn SM, Boyault S, Brock JE, Broeks A, Butler A, Desmedt C, Dirix L, Dronov S, Fatima A, Foekens JA, Gerstung M, Hooijer GK, Jang SJ, Jones DR, Kim HY, King TA, Krishnamurthy S, Lee HJ, Lee JY, Li Y, McLaren S, Menzies A, Mustonen V, O'Meara S, Pauporté I, Pivot X, Purdie CA, Raine K, Ramakrishnan K, Rodríguez-González FG, Romieu G, Sieuwerts AM, Simpson PT, Shepherd R, Stebbings L, Stefansson OA, Teague J, Tommasi S, Treilleux I, Van den Eynden GG, Vermeulen P, Vincent-Salomon A, Yates L, Caldas C, van't Veer L, Tutt A, Knappskog S, Tan BK, Jonkers J, Borg Å, Ueno NT, Sotiriou C, Viari A, Futreal PA, Campbell PJ, Span PN, Van Laere S, Lakhani SR, Eyfjord JE, Thompson AM, Birney E, Stunnenberg HG, van de Vijver MJ,

Martens JW, Børresen-Dale AL, Richardson AL, Kong G, Thomas G, Stratton MR. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*. 2016 Jun 2;534(7605):47-54. doi: 10.1038/nature17676. Epub 2016 May 2. Erratum in: *Nature*. 2019 Feb;566(7742):E1. PMID: 27135926; PMCID: PMC4910866.

47\_Tarn C, Rink L, Merkel E, Flieder D, Pathak H, Koumbi D, Testa JR, Eisenberg B, von Mehren M, Godwin AK. Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 17;105(24):8387-92. doi: 10.1073/pnas.0803383105. Epub 2008 Jun 11. PMID: 18550829; PMCID: PMC2448846.

48\_Behjati S, Tarpey PS, Haase K, Ye H, Young MD, Alexandrov LB, Farndon SJ, Collord G, Wedge DC, Martincorena I, Cooke SL, Davies H, Mifsud W, Lidgren M, Martin S, Latimer C, Maddison M, Butler AP, Teague JW, Pillay N, Shlien A, McDermott U, Futreal PA, Baumhoer D, Zaikova O, Bjerkehagen B, Myklebost O, Amary MF, Tirabosco R, Van Loo P, Stratton MR, Flanagan AM, Campbell PJ. Recurrent mutation of IGF signalling genes and distinct patterns of genomic rearrangement in osteosarcoma. *Nat Commun*. 2017 Jun 23;8:15936. doi: 10.1038/ncomms15936. PMID: 28643781; PMCID: PMC5490007. PMID: 28643781

49\_Werner H. Tumor suppressors govern insulin-like growth factor signaling pathways: implications in metabolism and cancer. *Oncogene*. 2012 May 31;31(22):2703-14. doi: 10.1038/onc.2011.447. Epub 2011 Oct 3. PMID: 21963847.

50\_ <https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/61/1/JME-17-0254.xml>

51\_Vasylyeva TL, Ferry RJ Jr. Novel roles of the IGF-IGFBP axis in etiopathophysiology of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007 May;76(2):177-86. doi: 10.1016/j.diabres.2006.09.012. Epub 2006 Oct 2. PMID: 17011663; PMCID: PMC1892792.

52\_Bach LA. Insulin-like growth factor binding protein-6: the "forgotten" binding protein? *Horm Metab Res*. 1999 Feb-Mar;31(2-3):226-34. doi: 10.1055/s-2007-978723. PMID: 10226806.

53\_Bach LA. IGFBP-6 five years on; not so 'forgotten'? *Growth Horm IGF Res*. 2005 Jun;15(3):185-92. doi: 10.1016/j.ghir.2005.04.001. PMID: 15914054.

54\_Fu, P., Liang, G.J., Khot, S.S., Phan, R. and Bach, L.A. (2010), Cross-talk between MAP kinase pathways is involved in IGF-independent, IGFBP-6-induced Rh30 rhabdomyosarcoma cell migration. *J. Cell. Physiol.*, 224: 636-643. <https://doi.org/10.1002/jcp.22156>

55\_Koike, H., Ito, K., Takezawa, Y. et al. Insulin-like growth factor binding protein-6 inhibits prostate cancer cell proliferation: implication for anticancer effect of diethylstilbestrol in hormone refractory prostate cancer. *Br J Cancer* **92**, 1538-1544 (2005). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602520>

56\_Leon A. Bach, Ping Fu, Zhiyong Yang; Insulin-like growth factor-binding protein-6 and cancer. *Clin Sci (Lond)* 1 February 2013; 124 (4): 215-229. doi: <https://doi.org/10.1042/CS20120343>

57\_Ma, Y.L., Zeng, Q., Donley, D.W., Ste-Marie, L.-G., Gallagher, J.C., Dalsky, G.P., Marcus, R. and Eriksen, E.F. (2006), Teriparatide Increases Bone Formation in Modeling and Remodeling Osteons and Enhances IGF-II Immunoreactivity in Postmenopausal Women With Osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 21: 855-864. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060314>

58\_ <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.04.018>

59\_Cristiana Iosef, Theofanis Gkourasas, Christina Y. H. Jia, Shawn S.-C. Li, Victor K. M. Han, A Functional Nuclear Localization Signal in Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-6 Mediates Its Nuclear Import, *Endocrinology*, Volume 149, Issue 3, 1 March 2008, Pages 1214-1226, <https://doi.org/10.1210/en.2007-0959>

60\_ <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.10.046>

61\_Chang, WW., Lin, RJ., Yu, J. et al. The expression and significance of insulin-like growth factor-1 receptor and its pathway on breast cancer stem/progenitors. *Breast Cancer Res* **15**, R39 (2013). <https://doi.org/10.1186/bcr3423>

62\_Abdullah Alzaid, Jin-Hyoung Kim, Robert H. Devlin, Samuel A. M. Martin, Daniel J. Macqueen; Growth hormone transgenesis in coho salmon disrupts muscle immune function impacting cross-talk with growth systems. *J Exp Biol* 1 July 2018; 221 (13): jeb173146. doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.173146>

63\_Conese, M., D'Oria, S., Castellani, S. et al. Insulin-like growth factor-6 (IGFBP-6) stimulates neutrophil oxidative burst, degranulation and chemotaxis. *Inflamm. Res.* **67**, 107-109 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1107-6>

64\_Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 2008 Sep 15;22(18):2454-72. doi: 10.1101/gad.1693608. PMID: 18794343.

65\_Le H, Kleinerman R, Lerman OZ, Brown D, Galiano R, Gurtner GC, Warren SM, Levine JP, Saadeh PB. Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008 Nov-Dec;16(6):768-73. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00430.x. PMID: 19128247.

66\_Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature.* 2003 Mar 20;422(6929):313-7. doi: 10.1038/nature01493. Epub 2003 Mar 5. PMID: 12629553.

67\_Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature.* 2004 Oct 7;431(7009):707-12. doi: 10.1038/nature02962. Epub 2004 Sep 12. PMID: 15361885.

68\_Fendrich V, Esni F, Garay MV, Feldmann G, Habbe N, Jensen JN, Dor Y, Stoffers D, Jensen J, Leach SD, Maitra A. Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas. *Gastroenterology.* 2008



Aug;135(2):621-31. doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.011. Epub 2008 Apr 16. PMID: 18515092; PMCID: PMC2666349.

69\_Bailey JM, Mohr AM, Hollingsworth MA. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene*. 2009 Oct 8;28(40):3513-25. doi: 10.1038/onc.2009.220. Epub 2009 Jul 27. PMID: 19633682; PMCID: PMC2910592.

70\_Ma X, Sheng T, Zhang Y, Zhang X, He J, Huang S, Chen K, Sultz J, Adegboyega PA, Zhang H, Xie J. Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers. *Int J Cancer*. 2006 Jan 1;118(1):139-48. doi: 10.1002/ijc.21295. PMID: 16003737.

71\_Sheng T, Li C, Zhang X, Chi S, He N, Chen K, McCormick F, Gatalica Z, Xie J. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer*. 2004 Oct 13;3:29. doi: 10.1186/1476-4598-3-29. PMID: 15482598; PMCID: PMC524523.

72\_Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018 Feb 20;18(1):8-20. doi: 10.17305/bjbms.2018.2756. PMID: 29274272; PMCID: PMC5826678.

73\_Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature*. 2002 Aug 22;418(6900):892-7. doi: 10.1038/nature00989. Erratum in: *Nature* 2002 Nov 28;420(6914):445. PMID: 12192414.

74\_Dunaeva M, Michelson P, Kogerman P, Toftgard R. Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins. *J Biol Chem*. 2003 Feb 14;278(7):5116-22. doi: 10.1074/jbc.M209492200. Epub 2002 Nov 7. PMID: 12426310.

75\_Blotta S, Jakubikova J, Calimeri T, Roccaro AM, Amodio N, Azab AK, Foresta U, Mitsiades CS, Rossi M, Todoerti K, Molica S, Morabito F, Neri A, Tagliaferri P, Tassone P, Anderson KC, Munshi NC. Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2012 Dec 13;120(25):5002-13. doi: 10.1182/blood-2011-07-368142. Epub 2012 Jul 20. PMID: 22821765; PMCID: PMC3525024.

76\_Callahan BP, Wang C. Hedgehog Cholesterololysis: Specialized Gatekeeper to Oncogenic Signaling. *Cancers (Basel)*. 2015 Oct 14;7(4):2037-53. doi: 10.3390/cancers7040875. PMID: 26473928; PMCID: PMC4695875.

77\_doi: [10.3390/jdb4030023](https://doi.org/10.3390/jdb4030023)

78\_Hardy RY, Resh MD. Identification of N-terminal residues of Sonic Hedgehog important for palmitoylation by Hedgehog acyltransferase. *J Biol Chem*. 2012 Dec 14;287(51):42881-9. doi: 10.1074/jbc.M112.426833. Epub 2012 Oct 30. PMID: 23112049; PMCID: PMC3522284.

79\_Buglino JA, Resh MD. What is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J Biol Chem*. 2008 Aug 8;283(32):22076-88. doi: 10.1074/jbc.M803901200. Epub 2008 Jun 4. PMID: 18534984; PMCID: PMC2494920.

- 80\_Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):816-25. doi: 10.1038/sj.cdd.4401850. PMID: 16410796.
- 81\_Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*. 2004 Feb;5(2):190-8. doi: 10.1038/ni1028. Epub 2004 Jan 11. PMID: 14716310.
- 82\_Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Adorem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*. 1999 Oct 21;401(6755):811-5. doi: 10.1038/44605. PMID: 10548109.
- 83\_Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2003 Aug;15(4):396-401. doi: 10.1016/s0952-7915(03)00080-3. PMID: 12900270.
- 84\_Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem*. 2005 Feb 18;280(7):5571-80. doi: 10.1074/jbc.M410592200. Epub 2004 Dec 3. PMID: 15579900.
- 85\_Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Wada A, Hirayama T, Arditi M, Abreu MT. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 2004 Nov 1;173(9):5398-405. doi: 10.4049/jimmunol.173.9.5398. PMID: 15494486.
- 86\_Alvarado AG, Thiagarajan PS, Mulkearns-Hubert EE, Silver DJ, Hale JS, Alban TJ, Turaga SM, Jarrar A, Reizes O, Longworth MS, Vogelbaum MA, Lathia JD. Glioblastoma Cancer Stem Cells Evade Innate Immune Suppression of Self-Renewal through Reduced TLR4 Expression. *Cell Stem Cell*. 2017 Apr 6;20(4):450-461.e4. doi: 10.1016/j.stem.2016.12.001. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28089910; PMCID: PMC5822422.
- 87\_Takizawa H, Fritsch K, Kovtonyuk LV, Saito Y, Yakkala C, Jacobs K, Ahuja AK, Lopes M, Hausmann A, Hardt WD, Gomariz Á, Nombela-Arrieta C, Manz MG. Pathogen-Induced TLR4-TRIF Innate Immune Signaling in Hematopoietic Stem Cells Promotes Proliferation but Reduces Competitive Fitness. *Cell Stem Cell*. 2017 Aug 3;21(2):225-240.e5. doi: 10.1016/j.stem.2017.06.013. Epub 2017 Jul 20. Erratum in: *Cell Stem Cell*. 2020 Jul 2;27(1):177. PMID: 28736216.
- 88\_Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*. 2012 Jun;9(6):703-19. doi: 10.4161/rna.20481. Epub 2012 Jun 1. PMID: 22664915; PMCID: PMC3495743.
- 89\_DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev*. 2010 Jun;29(2):309-16. doi: 10.1007/s10555-010-9223-6. PMID: 20405169; PMCID: PMC2865635.
- 90\_He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol*. 2007 Apr;44(11):2850-9. doi: 10.1016/j.molimm.2007.01.022. Epub 2007 Feb 27. Erratum in: *Mol Immunol*. 2020 May 21;122:232-234. PMID: 17328955.

91\_Uno K, Kato K, Shimosegawa T. Novel role of toll-like receptors in *Helicobacter pylori* - induced gastric malignancy. *World J Gastroenterol*. 2014 May 14;20(18):5244-51. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5244. PMID: 24833854; PMCID: PMC4017039.

92\_Di Lorenzo A, Bolli E, Tarone L, Cavallo F, Conti L. Toll-Like Receptor 2 at the Crossroad between Cancer Cells, the Immune System, and the Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 10;21(24):9418. doi: 10.3390/ijms21249418. PMID: 33321934; PMCID: PMC7763461.

93\_Hemmati S, Haque T, Gritsman K. Inflammatory Signaling Pathways in Preleukemic and Leukemic Stem Cells. *Front Oncol*. 2017 Nov 13;7:265. doi: 10.3389/fonc.2017.00265. PMID: 29181334; PMCID: PMC5693908.

94\_Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:93-106. doi: 10.1038/nri1779. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

95\_Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466:829-34. doi: 10.1038/nature09262. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

96\_Houshmand M, Soleimani M, Atashi A, Saglio G, Abdollahi M, Nikougofar Zarif M. Mimicking the Acute Myeloid Leukemia Niche for Molecular Study and Drug Screening. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017;23:72-85. doi: 10.1089/ten.tec.2016.0404. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

97\_Olsson B, Legros L, Guilhot F, Strömberg K, Smith J, Livesey FJ, Wilson DH, Zetterberg H, Blennow K. Imatinib treatment and A $\beta$ 42 in humans. *Alzheimers Dement*. 2014 Oct;10(5 Suppl):S374-80. doi: 10.1016/j.jalz.2013.08.283. Epub 2013 Dec 10. PMID: 24331439.

98\_Elzbieta Poreba, Julia Durzynska, Nuclear localization and actions of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) system components: Transcriptional regulation and DNA damage response, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, Volume 784, 2020, 108307, ISSN 1383-5742, <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108307>.  
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574219300973>)

99\_Sanchez P, Clement V, Ruiz i Altaba A. Therapeutic targeting of the Hedgehog-GLI pathway in prostate cancer. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):2990-2. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0439. PMID: 15833820.

100\_Yamazaki, M., Nakamura, K., Mizukami, Y., Ii, M., Sasajima, J., Sugiyama, Y., Nishikawa, T., Nakano, Y., Yanagawa, N., Sato, K., Maemoto, A., Tanno, S., Okumura, T., Karasaki, H., Kono, T., Fujiya, M., Ashida, T., Chung, D.C. and Kohgo, Y. (2008), Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. *Cancer Science*, 99: 1131-1138. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00795.x>

101\_Chen, X., Horiuchi, A., Kikuchi, N., Osada, R., Yoshida, J., Shiozawa, T. and Konishi, I. (2007), Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: It's inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer Science*, 98: 68-76. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00353.x>

102\_Su W, Meng F, Huang L, Zheng M, Liu W, Sun H. Sonic hedgehog maintains survival and growth of chronic myeloid leukemia progenitor cells through  $\beta$ -catenin signaling. *Exp Hematol*. 2012 May;40(5):418-27. doi: 10.1016/j.exphem.2012.01.003. Epub 2012 Jan 10. PMID: 22240607.

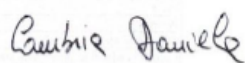
103\_Dierks C, Beigi R, Guo GR, Zirlik K, Stegert MR, Manley P, Trussell C, Schmitt-Graeff A, Landwerlin K, Veelken H, Warmuth M. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell*. 2008 Sep 9;14(3):238-49. doi: 10.1016/j.ccr.2008.08.003. PMID: 18772113.

104\_Sadarangani, A., Pineda, G., Lennon, K.M. et al. GLI2 inhibition abrogates human leukemia stem cell dormancy. *J Transl Med* 13, 98 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0453-9>

105\_Zhao, C., Chen, A., Jamieson, C. et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 458, 776-779 (2009). <https://doi.org/10.1038/nature07737>

106\_Zhao S, Zhang Y, Zhang Q, Wang F, Zhang D. Toll-like receptors and prostate cancer. *Front Immunol*. 2014 Jul 23;5:352. doi: 10.3389/fimmu.2014.00352. PMID: 25101092; PMCID: PMC4107957.

Firma Dottoranda



Firma Tutor

