

CELLULE STAMINALI LEUCEMICHE

Roberta Riccioni, Elvira Pelosi, Giovanna Marziali, Catherine Labbaye, Ugo Testa
 Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Le Leucemie Acute Mieloidi (LAM) sono malattie neoplastiche delle cellule ematopoietiche caratterizzate dall'accumulo di cellule mieloidi bloccate dalle LAM deriva dall'acquisizione di una serie di eventi mutageni e di modificazioni epigenetiche a livello di cellule staminali/progenitori emopoietici. Le varie LAM sono molto eterogenee per le loro anomalie molecolari, caratteristiche fenotipiche e origine cellulare. In conseguenza di tali eventi queste cellule acquisiscono un vantaggio proliferativo e di sopravvivenza rispetto alla controparte normale e risultano più o meno bloccate nel loro processo differenziativo. Studi condotti negli ultimi tre decenni hanno consentito d'identificare le cellule che iniziano e mantengono il processo leucemico (cellule staminali leucemiche, CSL) e di sviluppare modelli animali per studiare lo sviluppo di queste leucemie. Queste ricerche rappresentano il volano per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici e per lo sviluppo di terapie miranti ad eradicare le componenti cellulari che iniziano e mantengono il processo leucemico.

Cellule staminali normali

La produzione continua delle cellule del sangue richiede la divisione delle cellule staminali ematopoietiche (CSE) che genera sia nuove cellule staminali tramite un processo di auto-rinnovamento, sia una progenie di cellule differenziate. Anche una parte della progenie di cellule differenziate possiede la capacità di auto-rinnovamento, ma solo le cellule staminali posseggono la capacità di auto-mantenersi a lungo termine, generando cellule identiche alla cellula staminale originaria. Da un punto di vista sperimentale le CSE vengono saggiate per la loro capacità di ripopolare il sistema ematopoietico a lungo termine in animali immunodeficienti (1). Le cellule capaci di ripopolare questi topi a lungo termine, così come animali recipienti secondari, sono ritenute CSE. Una strategia comunemente adottata per la purificazione e l'isolamento di CSE putative consiste nella selezione di frazioni cellulari separate in base all'espressione di antigeni di membrana, seguita dal trapianto delle stesse in topi immunodeficienti NOD/SCID.

Il saggio nei topi immunodeficienti NOD/SCID riveste un ruolo fondamentale nello studio delle CSE. In questo saggio *in vivo* un ruolo fondamentale è rappresentato dal grado di immunodeficienza dei topi nudi utilizzati come riceventi delle preparazioni di CSE. Consistenti progressi in questa metodologia sono stati ottenuti grazie alla deplezione di cellule NK con anticorpi anti-CD22 (2), l'utilizzo di topi NOD/SCID-beta2-microglobulina deficienti in cellule NK (3), inoculo delle cellule direttamente in sede intra-femorale (4), delezione dell'IL-2R gamma (5). I topi NOD/SCID con delezione dell'IL-2R gamma (NOD/SCID/IL-2R $\gamma^{-/-}$) hanno una aumentata capacità ricettiva di CSE umane (6). Tramite saggi di ripopolamento di topi immunodeficienti è stato possibile dimostrare che le CSE sono presenti a livello della frazione CD34⁺/CD38⁻ di cellule ematopoietiche (7, 8). Utilizzando dei ceppi di topi più

immunodeficienti (NSG) è stato possibile dimostrare che anche le cellule CD34⁺/CD38⁺ sono in grado di ripopolare i topi immunodeficienti, ma solo a breve termine, mentre la capacità di ripopolamento a lungo termine è una proprietà presente solo a livello della frazione CD34⁺/CD38⁻ (9-12). È importante notare che le CSE vengono rinvenute anche a livello della frazione cellulare CD34⁻: CSE CD34⁻ generano *in vivo* CSE CD34⁺ (13).

In base alla loro capacità di ripopolare l'ematopoiesi le CSE vengono suddivise in tre differenti categorie: *CSE a breve termine* che sono in grado di generare cloni di cellule ematopoietiche che si differenziano e generano una progenie di cellule emopoietiche mature per 4-6 settimane; *CSE a medio termine*, che sono in grado di generare una progenie di cellule emopoietiche per 6-8 mesi, prima di estinguere la propria attività come CSE; *CSE a lungo termine* in grado di mantenere indefinitamente l'ematopoiesi (14).

Sono stati riportati alcuni modelli per descrivere il processo differenziativo ematopoietico a partire dalle CSE. Secondo il modello classico dell'ematopoiesi, *il modello della successione clonale*, il processo differenziativo ematopoietico avviene in maniera clonale a partire da una singola CSE. Più di recente è stato proposto un modello alternativo, *modello della diversità clonale*, che prevede che differenti tipi di cellule staminali ematopoietiche siano in grado di contribuire alla formazione di tutte le cellule del sangue, ma sono programmate a fare ciò in maniera stocastica, in parte controllata da segnali micro ambientali. Sebbene il primo modello sia stato a lungo supportato, studi recenti hanno fornito importanti evidenze sperimentali in favore del secondo modello. Infatti, tramite esperimenti di trapianto sequenziale di singole cellule staminali è stato possibile dimostrare che esse possono essere classificate in quattro tipi diversi in base alle loro capacità differenziative e alla durata temporale con la quale sono in grado di supportare *in vivo* un consistente livello di produzione di cellule ematopoietiche (15). Inoltre, esperimenti di purificazione e caratterizzazione di cellule staminali emopoietiche hanno mostrato l'esistenza di alcune CSE più orientate in senso mieloide e di altre CSE più orientate in senso linfoide: queste due popolazioni di CSE rispondono in maniera differenziale al TGF-beta (16). Queste osservazioni suggeriscono l'esistenza di uno spettro continuo di CSE.

Le CSE e i progenitori si localizzano in aree peculiari del midollo note come nicchie. Queste nicchie costituiscono delle piccole aree microambientali che rivestono un ruolo fondamentale nel controllo dello stato di quiescenza e del destino differenziativo e dell'auto-replicazione delle CSE. La costituzione esatta di queste nicchie non è stata ancora determinata con certezza, ma è chiaro che gli osteoblasti e le cellule endoteliali sono costituenti essenziali di queste microstrutture. Inoltre, un ruolo peculiare nelle nicchie viene rivestito dalle cellule reticolari che sono responsabili della produzione di *Stromal Derived Factor-1α* (SDF-1α), una chemochina essenziale per l'*homing* delle CSE, e di *Stem Cell Factor*, una citochina essenziale per garantire la sopravvivenza delle CSE. Le cellule reticolari presenti a livello delle nicchie sono dei progenitori osteo-adipogenetici che hanno le potenzialità di differenziare non solo in senso emopoietico, ma anche in senso adipogenico e osteogenico. Le capacità differenziative osteogeniche e adipogeniche di queste cellule sono essenziali al fine di mantenere nel midollo condizioni microambientali ottimali per la sopravvivenza delle CSE e per il loro mantenimento in uno stato indifferenziato (17). Sempre di recente è stata poi identificata anche l'esistenza di cellule staminali mesenchimali (CSM) a livello della nicchia ematopoietica: queste CSM sono presenti in stretta associazione con CSE (18). È altresì interessante notare che queste CSM sono strettamente associate con fibre del sistema nervoso simpatico che regolano la mobilitazione delle CSE e sono responsabili delle oscillazioni circadiane del numero delle CSE circolanti (19). Infine, queste CSM hanno un'espressione molto elevata di una serie di molecole, quali SDF-1α, SCF, Ang-1, VCAM-1, osteopontina, essenziali per l'*homing* e la sopravvivenza delle CSE (18). Infine, studi recenti indicano che i macrofagi sono un ulteriore costituente cellulare delle nicchie midollari, dove svolgono un ruolo essenziale per mantenere l'*homing* midollare delle

CSE (20-22). Questi studi hanno anche consentito di dimostrare un ruolo essenziale dei monociti nel mediare la mobilitazione delle CSE indotta dal G-CSF, una pratica impiegata da anni per procedure di autotrapianto. Infatti, è stato possibile documentare un effetto essenziale in questo complesso fenomeno da parte dei monociti che esprimono sulla loro membrana il recettore del G-CSF (21).

A livello della nicchia delle CSE l'interazione fra recettori presenti a livello della membrana delle CSE e ligandi (in genere presenti sotto forma di ligandi ancorati alla membrana delle cellule stromali) è essenziale per tutte le funzioni essenziali delle CSE. Gli studi condotti negli ultimi anni hanno portato all'identificazione di numerosi fattori di crescita/citochine (quali SCF, trombopoietina, ligandi di Notch, angiopoietina-1, proteine angiopoietina-simili e prostglandina E2) che sono essenziali per l'auto-replicazione, sopravvivenza e differenziazione delle CSE.

La capacità delle CSE di mantenere all'interno della nicchia l'autoreplicazione e la multipotenza dipende dalla sommatoria di una complessa serie di segnali mediati dal microambiente. Fra questi vari fattori, la bassa tensione di ossigeno (ipossia), gioca un ruolo essenziale nell'ambito dei vari meccanismi che consentono di mantenere le CSE in uno stato indifferenziato (24). Infatti, studi recenti hanno consentito di dimostrare che nel midollo osseo esiste un gradiente di O₂ tra il 6% di ossigeno presente a livello della cavità sinusodale e l'1% di ossigeno presente a livello della nicchia delle CSE. In accordo con questi studi è stato possibile dimostrare che le nicchie di CSE più attive si ritrovano a livello della regione endosteale del midollo osseo (25) e sono caratterizzati da una tensione particolarmente bassa di O₂, dovuta a basso flusso ematico (26). Gli effetti dell'ipossia sulle cellule sono mediati dal fattore trascrizionale HIF-1 che determina delle modificazioni nel programma di espressione genica che consentono alle cellule un adattamento alle condizioni d'ipossia. In particolare, l'attivazione di HIF-1 a livello delle CSE causa uno *shift* del metabolismo energetico dalla catena ossidativa mitocondriale alla glicolisi (27) e determina un ridotto ciclaggio delle CSE e un mantenimento a lungo termine dell'attività ripopolante ematopoietica (28).

In condizioni normali la maggior parte delle CSE sono cellule quiescenti che presentano un'attività ciclante molto lenta; tuttavia, le CSE in risposta a specifici stimoli microambientali sono capaci di un'intensa attività proliferativa, associata ad una spiccata capacità espansiva al fine di garantire la ricostituzione del sistema ematopoietico. Lo stato di quiescenza delle CSE è considerato come un importante meccanismo protettivo nei confronti dei rischi derivanti da continue replicazioni del DNA e del metabolismo ossidativo cellulare (29). Le CSE possiedono degli importanti meccanismi di protezione che consentono la loro sopravvivenza dopo esposizione ad agenti che danneggiano il DNA quali le radiazioni ionizzanti, caratterizzati a livello molecolare dall'elevata espressione di geni anti-apoptotici, dalla spiccata capacità d'indurre p53 che, a sua volta, media blocco della proliferazione cellulare e induzione dei meccanismi di riparo del DNA; al contrario, la maggior parte dei progenitori emopoietici vanno incontro ad apoptosi in seguito ad esposizione ad un agente genotossico (30). Tuttavia, la quiescenza delle CSE è un meccanismo che ha anche una controparte potenzialmente negativa in quanto, se da un lato protegge le CSE contro potenziali meccanismi di stress endogeno, dall'altro lato rende queste cellule intrinsecamente vulnerabili a mutagenesi in seguito a danno del DNA (30).

Gli elementi del sangue vengono generati a livello dei siti colonizzati dalle CSE durante l'ontogenesi (ad esempio, fegato fetale durante la vita fetale e midollo osseo durante la vita adulta) ad eccezione dei T linfociti che sono generati nel timo a partire da progenitori derivati dalle CSE e migrati in quest'organo. I primi elementi cellulari prodotti in seguito a differenziazione delle CSE consistono in una serie di progenitori con capacità differenziative sempre più ridotte, fino alla generazione di progenitori unipotenti. L'insieme di tutti questi eventi corrisponde a ciò che è noto come commissionamento o scelta del destino cellulare.

Secondo un modello dell'ematopoiesi oggi considerato classico, le CSE generano dapprima dei progenitori multipotenti (*Multipotent progenitor*, MPP) che non posseggono capacità autoreplicativa e quindi, attraverso la differenziazione dei MPP ad un progenitore comune mieloide (*Common myeloid progenitor*, CMP), capace di generare tutte le cellule della linea mieloide (granulociti, monociti, megacariociti, eritroblasti, cellule dendritiche) e un progenitore comune linfoide (*Common lymphoid progenitor*, CLP), capace di generare tutti i tipi di cellule linfoidi, B, T, NK e NKT linfociti. Studi recenti propongono un modello alternativo secondo il quale le CSE divergono inizialmente, attraverso un processo differenziativo, in CMP e in un progenitore comune mielo-linfoide (*Common lympho-myeloid progenitor*, CLMP) che genera T e B linfociti attraverso un progenitore bipotente T-mieloide e B-mieloide (31). Questo secondo modello ha di recente ricevuto supporto tramite studi di caratterizzazione di sottopopolazioni di progenitori umani del sangue di cordone e del midollo osseo. Sulla base di questi studi è stata ottenuta evidenza che due tipi di progenitori vengono generati dalla differenziazione delle CSE: un progenitore CMP, identificato come una cellula $CD34^+CD38^+IL-3R\alpha^+CD45RA^-$, capace di generare tutti i tipi di elementi mieloidi attraverso tappe differenziative intermedie che generano progenitori bipotenti Mk/E e G/Mo; un CLMP che può essere identificato come una cellula $CD34^+CD38^+CD45RA^+,Thy-1^{neg/low}$, capace di generare *in vitro* e *in vivo* tutti gli elementi linfoidi (T, B, Nk e NKT) e alcuni elementi mieloidi (monociti/macrofagi e cellule dendritiche) (32).

Questi studi hanno portato a chiarire almeno in parte gli stadi precoci della differenziazione dei T linfociti, in particolare consentendo di delineare un processo di differenziazione T linfoide così articolato: (i) le cellule staminali/progenitori linfoidi migrano a livello timico; (ii) queste cellule differenziano inizialmente fino a raggiungere uno stadio differenziativo, DN1, a livello del quale sono ancora multipotenti (cioè possono generare T e B linfociti, macrofagi e cellule dendritiche); (iii) durante lo stadio differenziativo successivo, DN2, i progenitori timici si localizzano a livello di nicchie tissutali, dove sotto l'effetto dell'IL-7 e di Notch-1, hanno luogo i primi stadi molecolari del commissionamento in senso T linfoide; (iv) sotto effetto del microambiente timico, viene indotta l'espressione del fattore trascrizionale Bcl 11b nei progenitori timici e questo determina un pieno commissionamento in senso T linfoide, con attivazione dell'espressione del recettore delle cellule T, repressione di capacità differenziative alternative e blocco delle proprietà staminali (33). Gli studi sugli stadi precoci della differenziazione B linfoide hanno consentito di ricostruire una cascata differenziativa che, partendo dai CLMP passa inizialmente per: (i) la progressiva generazione di progenitori (progenitori CLP), caratterizzata fenotipicamente dall'espressione prima di CD19 e poi di CD10; (ii) la differenziazione di questi progenitori in linfociti pro-B e pre-B (34).

Leucemie acute

Le leucemie acute derivano dalla trasformazione neoplastica di cellule staminali e/o di progenitori emopoietici. Due tipi di eventi possono portare allo sviluppo di una leucemia acuta: (i) una CSE acquisisce una serie di mutazioni (derivanti da vari tipi di eventi genetici) e di cambiamenti epigenetici conseguenti che alterano la loro capacità proliferativa, aumentano la resistenza all'apoptosi e interferiscono in maniera più o meno completa con la capacità di differenziazione di queste cellule; (ii) cellule emopoietiche differenziate, in seguito ad una serie di eventi mutazionali, riacquisiscono un programma di espressione genica che consente a queste cellule il ripristino di proprietà staminali, interferendo in parallelo con la capacità di queste cellule di progredire nel processo differenziativo.

Le traslocazioni ricorrenti che si osservano nelle leucemie acute risultano nella generazione di proteine di fusione chimeriche che funzionano come regolatori della trascrizione o come controllori della crescita cellulare. Queste proteine di fusione contribuiscono in maniera rilevante allo sviluppo e al mantenimento del processo leucemico determinando una deregolazione dell'attività trascrizionale, dovuta in larga parte a modificazioni epigenetiche, quali metilazione o demetilazione del DNA, modifiche a livello degli istoni, a cambiamenti a livello dell'espressione dei micro-RNA. In aggiunta a queste proteine di fusione, mutazioni a livello di geni che mediano eventi chiave nei processi di *signaling* cellulare o a livello di geni codificanti fattori trascrizionali svolgono un ruolo chiave nel processo leucemogenetico.

Le LAM in base ad una serie di caratteristiche, fundamentalmente rappresentate da alcune aberrazioni cromosomiche e/o mutazioni geniche, vengono suddivise in tre gruppi a prognosi diversa: (i) gruppo a prognosi favorevole, caratterizzato da alcuni eventi molecolari caratteristici quali anomalie citogenetiche t(15;17)[PML-RAR α], t(8;21)[AML1/ETO] e Inv(16)/t(16;16) e rappresentante circa il 30-35% delle LAM; (ii) gruppo a prognosi intermedia caratterizzato in genere da LAM non associate ad anomalie citogenetiche evidenti è costituito da un gruppo eterogeneo di leucemie nelle quali sono presenti vari tipi di mutazioni: in 25-30% dei pazienti mutazioni del recettore FLT3 del tipo ITD (in questo caso la prognosi peggiora); in circa il 50% mutazioni del gene nucleofosmina1 (NPM1), che, in assenza di FLT3/ITD, conferiscono una prognosi favorevole; in circa il 60% mutazioni del gene codificante la DNA metiltransferasi DNMT3A, associate ad una prognosi non favorevole; in circa il 30% mutazioni dei geni dell'isocitrato deidrogenasi 1 e 2 (IDH1 e IDH2) che conferiscono una prognosi non favorevole; in circa il 10% mutazioni del gene codificante il fattore trascrizionale C/EBP α che si associano ad una prognosi favorevole; altri casi, infine, presentano mutazioni del gene WT1, il cui significato prognostico non è ben definito; (iii) gruppo a prognosi sfavorevole, caratterizzato dalla presenza di complesse anomalie citogenetiche rappresentate da delezioni del cromosoma 5, 5q, inv(3)/t(3;3), t(6;9), t(9;22), Abn(3q), trisomia del cromosoma 7 e anomalie cromosomiche multiple (35).

Cellule staminali leucemiche nelle LAM

La scoperta delle CSL nelle LAM è iniziata con la dimostrazione che la maggior parte dei blasti in queste leucemie non proliferano e solo circa l'1% di essi formano colonie quando vengono piastrati in mezzo semisolido. Le colonie che si formano in queste condizioni sono definite come AML-CFU (*Acute Myeloid Leukemia-Colony Forming Units*). Tuttavia, le AML-CFU non corrispondono a CSL. La prima dimostrazione relativa all'esistenza delle CSL nelle LAM è stata ottenuta tramite saggi di ripopolamento di topi NOD/SCID con cellule leucemiche. A tale scopo sono state utilizzate frazioni cellulari di LAM isolate tramite marcatura con anticorpi e *sorting* al citofluorimetro. Le cellule leucemiche capaci di crescere nei topi nudi sono considerate come la controparte leucemica delle CSE normali. Studi iniziali effettuati tramite saggio nei topi NOD/SCID hanno indicato che CSL vengono riscontrate solo nella frazione CD34⁺/CD38⁻, ma non in quella CD34⁺/CD38⁺ o in altre frazioni cellulari (36-39). Dato che le AML-CFU sono contenute esclusivamente nella frazione CD34⁺/CD38⁻ si è ritenuto che queste osservazioni potessero supportare un'organizzazione gerarchica del clone leucemico con a capo le CSL, che generano una progenie cellulare inizialmente composta dalle AML-CFU e poi da blasti leucemici bloccati a vari stadi differenziativi. Studi seriali di trapianto di CSL hanno mostrato che, così come le CSE normali, le CSL sono composte da cellule eterogenee che differiscono per la loro capacità d'iniziare e mantenere il processo leucemico.

Tuttavia, studi successivi hanno mostrato che le CSL sono presenti anche nella frazione CD34⁺/CD38⁺. Infatti, in alcune LAM cellule presenti nella frazione CD34⁺/CD38⁺ sono capaci d'iniziare e mantenere la leucemia quando inoculate nei topi NOD/SCID (40). È importante notare che in alcune LAM nelle quali la frazione CD34⁺/CD38⁻ non era in grado d'iniziare il processo leucemico dopo inoculo nei topi nudi NOD/SCID, la frazione CD34⁺/CD38⁺ si mostrava leucemogena (40). La discrepanza fra questo studio e quelli eseguiti in precedenza risiede nell'osservazione che l'anticorpo monoclonale anti-CD38 utilizzato per gli studi di frazionamento cellulare ha uno spiccato effetto negativo sull'attecchimento delle cellule di LAM nel topo NOD/SCID (41). Più di recente, è stato possibile dimostrare che in una discreta percentuale di LAM le cellule inizianti la leucemia erano presenti nella frazione CD34⁻. Questi studi sono stati basati sull'analisi delle CSL in un gruppo di pazienti con mutazioni della nucleofosmina, utilizzando come recipienti i ceppi più immunodeficienti di topi NOD/SCID. Queste LAM vengono considerate un gruppo separato di leucemie acute e sono caratterizzate da una bassa espressione del CD34. In circa il 50% di queste LAM, la frazione CD34⁻ è risultata contenere le CSL, mentre la frazione CD34⁺ risultava contenere i progenitori e le cellule staminali normali. Nel rimanente 50% dei pazienti, le CSL sono presenti sia a livello della frazione CD34⁺ che della frazione CD34⁻ (42). Le LAM con CSL contenute esclusivamente nella frazione CD34⁻ suggeriscono che queste cellule potrebbero derivare o dalla trasformazione leucemica di CSE CD34⁻ o di CDE CD34⁺ che hanno perso l'espressione del CD34. Queste osservazioni corroborano ulteriormente il concetto che il fenotipo delle CSL nelle LAM è eterogeneo. Queste osservazioni hanno trovato in larga misura conferma in uno studio successivo che ha potuto dimostrare che nei pazienti LAM con mutazioni della nucleofosmina la frazione CD34⁺ contiene frequentemente le CSL, mentre più raramente le CSL sono presenti a livello della frazione CD34⁻ (43).

Oltre agli studi effettuati sui tipi più comuni di LAM, alcuni studi di caratterizzazione delle CSL sono stati effettuati in sottotipi specifici di LAM, caratterizzati da traslocazioni cromosomiche specifiche che danno luogo alla formazione di proteine di fusione quali PML-RAR α e DEK/CAN. Questi studi sono particolarmente importanti in quanto contribuiscono a chiarire il ruolo leucemogenetico di queste proteine di fusione a livello di progenitori/cellule staminali. La traslocazione t(6;9)(p23;q34) viene osservata in circa 1-2% delle LAM e genera un trascritto di fusione fra il gene DEK e il gene CANNUP214 (44). Il ruolo leucemogeno di DEK/CAN è stato esplorato in un modello animale utilizzando CSE murine. I risultati di questi esperimenti hanno indicato che il processo leucemogenetico ha origine in una sottopopolazione di CSE, mentre la propagazione dello stesso è mediata sia da cellule con fenotipo staminale che con fenotipo di progenitori. Queste osservazioni inducono a ritenere che in questo modello di LAM esiste un'importante differenza fra le cellule che iniziano e quelle che mantengono il processo leucemico.

La situazione è chiaramente diversa nelle Leucemie Acute Promielocitiche (LAP), caratterizzate dalla traslocazione t(15;17) che genera la formazione del gene di fusione PML-RAR α . Tutti i tentativi rivolti ad ottenere l'attecchimento di cellule di LAP nei topi nudi sono sistematicamente falliti. Pertanto, l'origine cellulare delle LAP è stata esplorata in modelli murini di leucemia. Uno di questi modelli è basato sull'espressione del gene di fusione PML-RAR α sotto il controllo del promotore endogeno murino del gene della catepsina G: in questo modello, la leucemia si sviluppa in un compartimento di cellule a differenziazione terminale, i promielociti (45), cellule che non hanno capacità autoreplicativa. Uno studio più recente ha mostrato che l'acquisizione della capacità di auto-rinnovo a livello dei promielociti è mediata da PML-RAR α come una tappa iniziale nella patogenesi delle LAP (46). Più informativi sono risultati i modelli murini di LAP nei quali il gene PML-RAR α è espresso a partire dal locus del gene PML murino: in questo caso l'effetto precipuo di PML-RAR α a livello dei progenitori

emopoietici è consistito nell'induzione del loro auto-rinnovamento, determinando in tal modo l'espansione di cellule che sono suscettibili di acquisire mutazioni secondarie che causano la progressione verso un processo leucemico (47). Particolarmente informativo è risultato uno studio in un modello murino di LAP nel quale è stato mostrato l'isolamento di una sottopopolazione di progenitori mieloidi a partire da un topo transgenico PML-RAR α , capace di generare leucemia in maniera efficiente in topi recipienti. Sulla base di queste osservazioni è stato proposto che progenitori mieloidi commissionati possano essere le cellule di origine delle LAP (48). Infine, altri studi suggeriscono un'interpretazione in parte diversa, indicando che le CSE possano rappresentare il bersaglio iniziale e i progenitori emopoietici più maturi rappresentino i bersagli cellulari per la trasformazione leucemica definitiva (49).

Una serie di studi ha analizzato in dettaglio le variabili che influenzano l'attecchimento delle CSL nei topi immunodeficienti. In quest'ambito, una variabile fondamentale è legata al tipo di ceppo di topo immunodeficiente utilizzato per lo xenotrapianto. Topi non-obesi diabetici (NOD/SCID) sono stati correntemente utilizzati per studiare *in vivo* le LMA umane (36-39). Utilizzando questo saggio *in vivo* con i ceppi di topi standard NOD/SCID si è potuto dimostrare che circa il 50% (44), 60% (38) delle LAM sono in grado di crescere *in vivo* nei topi nudi. La capacità dei vari campioni di LAM di crescere nei topi NOD/SCID è correlata ad una prognosi negativa (50). Tuttavia è importante notare che il livello di attecchimento delle cellule leucemiche nei vari topi NOD/SCID è di solito basso, con livelli compresi fra lo 0,1% e il 5% di cellule umane CD45⁺ riscontrate a livello del midollo murino. L'utilizzo di topi nudi che presentano anche delezione del gene della beta2 microglobulina è risultato in un più elevato attecchimento delle cellule leucemiche (51). Più di recente l'utilizzo di topi nudi con delezione della catena γ -comune (topi NSG) ha rappresentato un ospite con un ambiente più idoneo per la crescita e lo sviluppo di cellule di LAM. Utilizzando questo tipo di topi è stato possibile dimostrare che l'inoculo cranio-faciale nei topi neonati NSG con cellule di LAM umane porta ad un elevato livello di attecchimento di cellule leucemiche nel topo (52). Facendo ricorso ad una via d'inoculo più semplice, la vena della coda, e topi NSG adulti Sanchez e collaboratori hanno riportato il 66% di attecchimento di campioni di LAM in questi topi; è altresì importante notare che una significativa percentuale di topi NSG (il 37%) presentava un elevato livello (>10% delle cellule midollari) di cellule leucemiche *in vivo* (53). Una metodica alternativa per ottenere un elevato livello di attecchimento di cellule leucemiche nei topi nudi consiste nell'ottenere in questi animali l'espressione costitutiva di citochine in grado di stimolare e sostenere la proliferazione delle cellule leucemiche *in vivo*. Pertanto, l'espressione transgenica di SCF, GM-CSF ed IL-3 in un background NOD/SCID ha generato un ceppo di topi nudi (NSS) che hanno una più elevata capacità recettiva e favoriscono l'attecchimento di cellule di LAM (51, 54). Più di recente è stato generato un nuovo ceppo di topi nudi tramite incrocio di topi NSG con topi NSS, con la risultante generazione di topi NSGS. Questi topi sono in grado di consentire un più elevato attecchimento di cellule leucemiche di LAM rispetto ad i topi NSG. Inoltre, alcuni casi di LAM che non sono in grado di sviluppare cellule leucemiche *in vivo* quando inoculati in topi nudi NSG, attecchiscono quando trapiantati in topi NSGS (55). Recentemente, l'utilizzo di topi nudi NSG ha consentito di dimostrare che l'attecchimento di cellule leucemiche di LAM può essere ottenuto in quasi tutti i casi. Inoltre, è stato possibile dimostrare che sia le LAM che esprimono cellule CD34⁺ che quelle che non presentano tali cellule sono capaci di attecchire nei topi NSG; inoltre, in alcuni casi sia le cellule CD34⁺/CD38⁻ che quelle CD34⁺/CD38⁺ sono in grado di attecchire nei topi NSG (56).

Il progressivo sviluppo degli studi e il concomitante affinamento delle tecnologie hanno portato ad un progressivo cambiamento dell'ipotesi inizialmente proposta per spiegare l'origine delle CSL. Infatti, nel modello iniziale proposto da Bonnet e Dick veniva suggerito che solo la frazione CD34⁺/CD38⁻ era in grado di avviare e mantenere il processo leucemico in topi

immunodeficienti e questa proprietà veniva perduta in seguito a differenziamento di queste cellule. Studi successivi hanno supportato un modello in parte diverso, definibile come un modello differenziativo, suggerendo che le CSL sono preferenzialmente, ma non esclusivamente, presenti a livello di popolazioni cellulari a fenotipo immaturo. Infine, più di recente è stato considerato il modello della plasticità leucemica che sostiene che le CSL non sono necessariamente arricchite a livello della frazione cellulare più immatura e la probabilità di possedere proprietà biologiche di CSL è indipendente dai marcatori differenziativi/maturativi.

Studi recenti forniscono diretto supporto in favore dei modelli differenziativo e della plasticità delle CSL. Infatti, in uno studio recente è stato analizzato un numero elevato di LAM, fornendo chiara indicazione che sia blasti leucemici con fenotipo staminale che con fenotipo di progenitori hanno proprietà biologico-funzionali di CSL (57). In particolare, in questo studio è stato esplorato in parallelo l'immunofenotipo, il fenotipo delle CSL e il profilo globale di espressione genica di un elevato numero di campioni di LAM, generando una serie di importanti osservazioni: (i) a livello delle cellule CD34⁺ due tipi di *pattern* immunofenotipico vengono frequentemente osservati, uno di tipo staminale (CD38⁻CD45RA⁺) e uno di tipo progenitore (CD38⁺CD45RA⁺); (ii) a livello delle cellule leucemiche presenti nella maggior parte dei pazienti, le due popolazioni coesistono; (iii) le due popolazioni differiscono per il profilo globale di espressione genica; (iv) una serie di dati ottenuti *in vitro* e *in vivo* hanno indicato che le due popolazioni di progenitori leucemici sono interdipendenti in maniera gerarchica: le cellule CD38⁻CD45RA⁺ danno luogo alle cellule CD38⁺CD45RA⁺ e non viceversa (57). Sebbene entrambi questi due tipi di cellule leucemiche si comportino come CSL, la frequenza di CSL è più elevata nella frazione CD38⁻CD45RA⁺ che in quella CD38⁺CD45RA⁺. Infine, un'osservazione molto importante di questo studio è che sia le cellule CD38⁻CD45RA⁺ che le cellule CD38⁺CD45RA⁺ somigliano molto di più a delle popolazioni di progenitori normali che di cellule staminali. Quest'osservazione suggerisce che in seguito alla trasformazione leucemica i progenitori emopoietici acquisiscono proprietà ibride, mantenendo da un lato le proprietà proliferative dei progenitori e acquisendo la caratteristica dell'auto-replicazione delle cellule leucemiche (57).

Il modello NOD/SCID dei topi trapiantati con cellule di LAM ha consentito anche di esplorare le interazioni fra le CSL e il microambiente midollare. L'*homing* delle CSL a livello midollare è modulato da un sistema di recettori (presenti sulle CSL) e di ligandi (secreti dalle cellule midollari o presenti sulla loro membrana). L'analisi dell'*homing* delle cellule leucemiche CD34⁺CD38⁻ ha mostrato che queste colonizzano il midollo osseo dei topi immunodeficienti e si localizzano principalmente a livello della regione endosteale (52). Le CSL localizzate a livello della regione endosteale sono in larga misura quiescenti e sono resistenti ad alcuni agenti antileucemici quali l'AraC (52). L'*homing* delle CSL a livello midollare riveste un ruolo importante nell'ambito del processo di sviluppo delle LAM e gioca anche un ruolo chiave nel determinare la sensibilità di queste cellule ai chemioterapici. L'integrina VLA-4 e il suo ligando Fibronectina presente a livello delle cellule stromali midollari, sono importanti per l'*homing* delle CSL a livello midollare e ne modulano in maniera negativa la sensibilità ai vari chemioterapici antileucemici (58). CD44, il recettore di varie molecole d'adesione, quali lo ialurano, il collagene e la laminina, è espresso a livello delle CSL e gioca un ruolo importante nel meccanismo di *homing* di queste cellule a livello midollare (59, 60). In saggi di ripopolamento di topi NOD/SCID con CSL di LAM si è potuto dimostrare che la somministrazione di anticorpi anti-CD44 inibisce l'attecchimento di tali cellule (60). Anche il recettore CXCR4 (espresso dalle CSL) e il suo ligando SDF-1 α (secreti dalle cellule staminali midollari) sembrano giocare un ruolo chiave nel meccanismo di *homing* e di chemoresistenza delle CSL; inoltre, elevati livelli di espressione del CXCR4 sui blasti leucemici, si associano ad una prognosi negativa (61-63).

L'identificazione delle CSL ha spronato una serie di studi miranti a determinare la presenza sulla membrana di queste cellule di molecole selettivamente o preferenzialmente espresse sulla compagine leucemica rispetto alle CSE normali. Gli studi condotti in tal senso hanno consentito d'identificare una serie di antigeni di membrana che hanno queste proprietà e che rappresentano bersagli potenziali per lo sviluppo di terapie innovative.

La catena α del recettore dell'interleuchina-3 (IL-3R α , noto come CD123) è stato dimostrato essere iperespresso sui blasti e sulle CSL delle LAM (64), ma non sulle CSL normali (65-67). Nei pazienti con anemia di Fanconi, una condizione che predispone allo sviluppo di LAM, le cellule CD34⁺CD123⁺, ma non quelle CD34⁺CD123⁻ mostrano attecchimento dopo trapianto in topi nudi (68). Un anticorpo neutralizzante anti-CD123 si è dimostrato capace d'inibire la sopravvivenza delle CSL di LAM *in vitro* e di bloccare *in vivo* l'attecchimento in topi nudi NOD/SCID (69). La versione umanizzata di questo anticorpo è in corso di valutazione nell'ambito di uno studio di fase I. Un'analisi *ad interim* di questo studio ha mostrato una buona tollerabilità dell'anticorpo anti-CD123 e su 8 pazienti trattati è stata osservata una risposta completa. Alternativamente all'anticorpo può essere utilizzata una proteina di fusione composta dall'IL-3 e una versione troncata della tossina difterica (70, 71) o da una proteina di fusione composta da una singola catena di un anticorpo anti-CD123 fuso con una versione troncata della tossina *Pseudomonas* (72).

Altri studi hanno documentato un'aumentata espressione dell'antigene CD47 sulle CSL di LAM, paragonata ai livelli osservati nelle CSE normali (73, 74). L'analisi dell'espressione di CD47 non consente di differenziare le CSL dai blasti leucemici; tuttavia, il CD47 è espresso solo a bassi livelli nel midollo osseo normale. CD47 funge da recettore del ligando *Signal Regulatory Protein- α* (SIRP- α) che è espresso sui macrofagi e sulle cellule dendritiche: l'interazione di SIRP- α con il CD47 induce una cascata di *cell signaling* che determina inibizione della fagocitosi. In accordo con quest'osservazione è atteso che un anticorpo bloccante anti-CD47 possa indurre la fagocitosi delle CSL. Studi *in vitro* supportano questa previsione, mostrando un potente effetto di anticorpi anti-CD47 sulle CSL, ma non sui progenitori/cellule staminali normali (73). Esperimenti *in vivo* hanno mostrato un chiaro effetto anti-leucemico di anticorpi anti-CD47. Tuttavia, il trattamento con l'anticorpo anti-CD47 è risultato curativo solo nel 40% degli animali, un fenomeno probabilmente legato all'incapacità di questo trattamento di eliminare una grossa massa di cellule leucemiche. Onde ovviare a questa limitazione sono state approntate due strategie: un pre-trattamento con agenti anti-leucemici standard al fine di ridurre la massa di cellule leucemiche o un pre-trattamento *in vivo* con G-CSF al fine di aumentare il numero di macrofagi in grado di fagocitare le cellule leucemiche (73). Il trattamento con anti-CD47 risulta efficace in modelli sperimentali anche per il *targeting* e la fagocitosi di CSL di leucemia acuta linfoide (75). È importante notare che il trattamento *in vivo* con anticorpo bloccante anti-CD47 ha un effetto selettivo sulle cellule leucemiche, risparmiando la controparte normale. La spiegazione di questo fenomeno è complessa e risiede nell'elevata espressione sulle cellule leucemiche della calreticulina, che è scarsamente espressa sulle cellule normali (76). La calreticulina induce un segnale pro-fagocitico in seguito ad interazione con il suo recettore, la proteina LDL recettore correlata, presente sulle cellule fagocitiche: questa attivazione viene inibita dal CD47 (76). Il trattamento con un anticorpo bloccante anti-CD47 rimuove l'effetto inibitorio del CD47 sulla risposta fagocitica calreticulina-mediata. L'insieme di queste osservazioni supportano lo sviluppo preclinico di una terapia basata sui trattamenti delle LAM con anticorpi bloccanti anti-CD47.

Un ulteriore marcatore delle CSL è rappresentato dalla proteina di membrana CD96, una molecola recettoriale di adesione. CD96 sembra essere un marcatore delle CSL di LAM, essendo chiaramente espresso nella maggioranza delle LAM a livello delle cellule CD34⁺CD38⁻, mentre la sua espressione è solo minoritaria a livello delle cellule CD34⁺CD38⁻ normali (77). Il

CD96 è particolarmente espresso sulle CSL delle LAM con mutazioni del gene WT1 e ciò si associa ad una prognosi negativa (78). Altre proteine di membrana, come CLL-1 e IREM-1 sono iperespresse sulle CSL delle LAM, rispetto a quanto osservato nelle CSE normali (79). L'espressione dell'antigene CLL-1, in associazione con altri parametri, consente un notevole arricchimento in CSL (80, 81).

Studi recenti hanno consentito l'identificazione di due nuovi marcatori di membrana delle CSL nelle LAM di potenziale impatto terapeutico. Infatti, utilizzando un approccio bioinformatico mirante a definire lo spettro di espressione differenziale genico delle cellule CD34⁺CD38⁻ di LAM rispetto alla loro controparte normale, Saito e collaboratori hanno identificato gli antigeni di membrana CD25 e CD32 come molecole specifiche delle CSL nel contesto delle LAM (82), CD32 è risultato espresso nel 34%, mentre CD25 nel 25% delle LAM: in queste LAM le frazioni cellulari CD34⁺CD38⁻CD32⁺ e CD34⁺CD38⁻CD25⁺, rispettivamente, sono in grado di determinare lo sviluppo di leucemia dopo inoculo nei topi NOD/SCID.

Contributo del Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare allo studio delle CSL

Lo sviluppo dello studio delle CSL è stato brevemente delineato nei paragrafi precedenti. In questo ambito, il nostro contributo è stato dedicato a due aspetti particolari: (i) studio di alcuni marcatori di membrana particolarmente espressi sulle CSL e loro possibile significato come bersagli terapeutici; (ii) analisi di un possibile effetto di alcuni farmaci anti-tumorali sulle CSL.

Lo studio degli antigeni di membrana si è concentrato sul CD123, la catena alfa del recettore dell'IL-3 e il CXCR4, il recettore della citochina *Stromal Derived Growth Factor-1 alfa* (SDF-1 α). Gli studi relativi al CD123 sono già stati menzionati e in questa sede preme sottolineare come il CD123 rappresenti un bersaglio, di notevole potenziale interesse terapeutico per due motivi essenziali: è espresso a livello delle CSL e la sua espressione su queste cellule è molto più elevata che nella controparte normale (65, 66); il CD123 è particolarmente iperespresso sulle CSL di alcune LAM che hanno una prognosi negativa (83, 84); la *targeting* delle CSL con IL-3 coniugata con tossina difterica (71) o con anticorpi specifici (69) induce la morte delle CSL.

Il CXCR4 è un recettore di membrana espresso sulle cellule staminali normali e leucemiche, che, in seguito ad attivazione tramite interazione con il suo ligando SDF-1 α , svolge un ruolo essenziale nei meccanismi che determinano l'*homing* delle cellule staminali. Il CXCR4 risulta essere molto espresso in alcune LAM e i suoi livelli di espressione di per se rappresentano un fattore prognostico negativo. I nostri studi hanno mostrato che il CXCR4 è molto espresso a livello di alcune LAM, caratterizzate dalla bassa espressione del miR-146a, un regolatore negativo dell'espressione del CXCR4 (85). In queste LAM il CXCR4 è espresso a livello delle CSL. È interessante notare che l'inibizione del CXCR4, tramite un inibitore chimico dello stesso (AMD3100) e tramite espressione forzata del miR-146a, potenzi significativamente la chemosensibilità di queste cellule ad agenti antileucemici quali l'AraC e l'adriamicina (86). Queste osservazioni suggeriscono che il CXCR4 possa rappresentare un bersaglio potenzialmente importante nel trattamento delle LAM in associazione con gli antitumorali comunemente utilizzati nel trattamento di queste leucemie. In tal senso è interessante notare che l'uso clinico dell'inibitore di CXCR4 AMD3100, quale agente mobilizzante le cellule staminali emopoietiche dal midollo osseo al sangue periferico, sia già stato autorizzato.

Gli studi relativi alla caratterizzazione dell'effetto di alcuni farmaci sulla vitalità delle cellule staminali leucemiche si sono concentrati sullo studio dell'effetto degli inibitori del proteosoma. Questa categoria di farmaci ha di recente trovato impiego nel trattamento del mieloma multiplo e

dei linfomi a mantella. Gli inibitori del proteosoma potrebbero avere anche come bersaglio cellulare le cellule leucemiche staminali. Infatti, nelle CSL viene riscontrata spesso un'attivazione costitutiva di NFκB, un fattore trascrizionale che attiva *pathways* anti-apoptotici e gli inibitori del proteosoma inducono un'inibizione di NFκB. Studi condotti su cellule leucemiche fresche hanno mostrato che il bortezomib, un inibitore del proteosoma era in grado d'indurre apoptosi di CLS di LAM (87). Tuttavia, non in tutti i casi di LAM viene osservata questa spiccata sensibilità agli inibitori del proteosoma in quanto in alcune di esse gli alti livelli basali di NRF2 rappresentano un fattore di resistenza agli inibitori del proteosoma. In questi casi, il trattamento con un inibitore di NRF2 rende le cellule leucemiche sensibili agli inibitori del proteosoma.

Conclusioni

Lo studio delle CSL nelle LAM è complesso e richiede l'utilizzo di una metodologia efficiente, in particolare per quanto riguarda il saggio di queste cellule *in vivo* in topi immunodeficienti. I progressi realizzati in questo settore hanno mostrato che utilizzando ceppi appropriati di topi immunodeficienti è possibile ottenere la crescita di cellule leucemiche nella maggior parte dei casi di LAM. Così come le analisi delle anomalie molecolari, anche questi studi relativi all'analisi dell'origine cellulare delle LAM hanno mostrato una grande eterogeneità di queste leucemie. Nonostante questa consistente eterogeneità delle CSL stato possibile identificare delle molecole di membrana che potrebbero rappresentare degli importanti bersagli terapeutici, da utilizzare in concerto con la chemioterapia antileucemica standard. In particolare, altri studi, non considerati nella presente rassegna, hanno evidenziato l'esistenza di vie di attivazione del segnale costitutivamente attivate nelle cellule leucemiche e in particolare nelle CSL delle LAM, che potrebbero rappresentare altri importanti bersagli terapeutici.

Bibliografia

1. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301:527-30.
2. Tanaka T, Kitamura F, Nagasaka Y, Kuida K, Suwa H, Miyasaka M. Selective long-term elimination of natural killer cells *in vivo* by an anti-interleukin 2 receptor beta chain monoclonal antibody in mice. *J Exp Med* 1993;178:1103-07.
3. Kollet O, Pelled A, Byk T. Beta2 microglobulin-deficient (B2m(null)) NOD/SCID mice are excellent recipient for studying human stem cell function. *Blood* 2000;95:3102-05.
4. Mazurier F, Doedens M, Gan OI, Dick JE. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nature Medicine* 2003;9:959-63.
5. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K. NOD/SCID/gamma null mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002;100:3175-82.
6. Notta F, Doulatov S, Dick JE. Engraftment of human hematopoietic stem cells is more efficient in female NOD/SCID/IL-2Rgc-null recipients. *Blood* 2010;115:3704-07.
7. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997;94:5320-25.
8. Civin CI, Almeida-Porada G, Lee MJ, Olweus J, Terstappen LW, Zanjani ED. Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells *in vivo*. *Blood* 1996;88:4102-09.

9. Hogan CJ, Shpall EJ, Keller G. Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34+ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:413-18.
10. McKenzie JL, Gan OI, Doedens M, Wang JC, Diock JE. Individual stem cells with highly variable proliferation and self-renewal properties comprise the human hematopoietic stem cell compartment. *Nat Immunol* 2006;7:1225-33.
11. Wang I, Kimura T, Asada R, Harada S, Yokota S, Kawamoto Y. SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34- cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood* 2003;101:2924-31.
12. Kitamura T, Asada R, Wang J, Kimura T, Morioka M, Matsui K. Identification of long-term repopulating potential of human cord blood-derived CD34-flt3- severe combined immunodeficiency-repopulating cells by intra-bone marrow injection. *Stem Cells* 2007;25:1348-55.
13. Kitamura T, Matsuoka Y, Kimura T, Takahashi M, Nakamoto T, Yosuda K, Matsui K. *In vivo* dynamic of human cord-blood derived CD34- SCID-repopulating cells using intra bone marrow injection. *Leukemia* 2010;24:162-8.
14. Benviste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, Iscove N. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* 2010;6:48-58.
15. Dykstra B, Kent D, Bowie M, McCoffrey L, Hamilton M, Lyons K, Lee SJ, Brinkman R, Eaves C. Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs *in vivo*. *Cell Stem Cell* 2007;1:218-29.
16. Challen GA, Boles NC, Chanebers SM, Goodell MA. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell* 2010;6:265-78.
17. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohgata H, Kondoh G, Fuji N, Kohno K, Nagasawa T. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 2010;33(3):387-99.
18. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Mä Ayan A, Emikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and hematopoietic stem cells from a unique bone marrow niche. *Nature* 2010;466:829-34.
19. Mendéz-Ferrer S, Lucas D, Batista M, Frenette PS. Hematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 2008;452:442-7.
20. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Méndez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheirrmann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N. Bone marrow CD169+ macrophage promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* 2011;208:261-71.
21. Christopher MJ, Rao M, Liu F, Woloszynek JR, Link DC. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *J Exp Med* 2011;208:251-60.
22. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, Poulton IJ, van Rooijen N, Alexander KA, Ragatt LJ, Levesque JP. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* 2010;116:4815-28.
23. Himburg HA, Muramoto GG, Daher P, Maedows SK, Russell JL, Doan P, Chi JT, Salter AB, Lento WE, Reya T, Chao NJ, Chute JP. Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2010;16:475-82.
24. Mohyeldin A, Garzom-Muvdi T, Quinones-Hirojsa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2010;7:150-61.

25. Gressinger J, Haylock DN, Williams B, Olsen GH, Nilsson SK. Phenotypically identical hemopoietic stem cells isolated from different regions of bone marrow have different biological potential. *Blood* 2010;116:3185-96.
26. Winkler IG, Barbier V, Wadley R, Zannettino A, Williams S, Levesque JP. Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood *in vivo*: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. *Blood* 2010;116:375-85.
27. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, DeBernardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider JW, Zhang CC, Sadek HA. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 2010;7:380-90.
28. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iruhashi H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7:391-402.
29. Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet* 2008;9:115-28.
30. Mohrin M, Bomke E, Alexander D, Wan MR, Barry-Holson K, Le Beau M, Morrison CG, Passegué E. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* 2010;7:174-85.
31. Kawamoto H, Wada H, Katsura Y. A revised scheme for developmental *pathways* of hematopoietic cells: the myeloid-based model. *Int Immunol* 2010;22:65-70.
32. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohoshi S, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature Immunol* 2010;11:585-93.
33. Di Santo JP. A guardian of T cell fate. *Science* 2010;329:44-5.
34. Sanz E, Munez N, Monserrat J, Van-Den-Rim A, Escoll P, Ranz I, Alvarez-Mon M, de-la-Hera A. Ordering human CD34+CD10-CD19+ pre/proB and CD19- common lymphoid progenitor stages in two pro-B-cell development *pathways*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:5925-30.
35. Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2011;29:475-85.
36. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation in SCID mice. *Nature* 1994;367:645-48.
37. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Med* 1997;3:730-37.
38. Ailles LE, Gerhard B, Kawagoe H, Hogge DE. Growth characteristics of acute myelogenous leukemia progenitors that initiate malignant hematopoiesis in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1999;94:1761-72.
39. Rombouts WJ, Martens AC, Ploemacher RE. Identification of variables determining the engraftment potential of human acute myeloid leukemia in the human NOD/SCID human chimera model. *Leukemia* 2000;14:889-97.
40. Hope KJ, Jin L, Dick SE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nature Immunol* 2004;5:738-43.
41. Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Alonso F, Pearce DJ, Allen K, Ridler C, Lillington D, Bonnet D. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* 2008;12: 568-75.
42. Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Maud F, Griessinger E, Sharrock K, Luke T, Lillington D, Bonnet D. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34- fraction. *Blood* 2010;115:1976-84.

43. Martelli AP, Pettirossi V, Thiede C, Bonifacio E, Mezzaroma F, Cecchini D, Martelli MF, Falini B. CD34+ cells from AML with mutated NPM1 harbor cytoplasmic mutated nucleophosmin and generate leukemia in immunocompromised mice. *Blood* 2010;116:3907-22.
44. Oancea C, Ruster B, Henschler R, Puccetti E, Ruthard M. The t(6;9) associated DEK/CAN fusion protein targets a population of long-term repopulating hematopoietic stem cells for leukemogenic transformation. *Leukemia* 2010;24:1910-19.
45. Westervelt P, Lane AA, Pollock JL, Oldtather K, Holt MS, Simonjic DB. High-penetrance mouse model of acute promyelocytic leukemia with very low levels of PML-RARalpha expression. *Blood* 2003;102:1857-65.
46. Wojiski S, Guibal FC, Kindler T, Lee BH, Jesmeck JL, Fabian A, Gilliland DG. PML-RARalpha initiates leukemia by conferring properties of self-renewal to committed promyelocytic progenitors. *Leukemia* 2009;23:1462-71.
47. Walch JS, Yuan W, Ley TJ. PML-RARA can increase hematopoietic self-renewal without causing a myeloproliferative disease in mice. *J Clin Invest* 2011;121:1836-41.
48. Guibal FC, Alberich-Jorda M, Hirai H, Ebzalidze A, Lavantini E, Di Ruscio A, Zhang P, Santana-Lemos B, Neuberg D, Wagers A, Rego E, Tenen DG. Identification of a myeloid committed progenitor as the cancer-initiating cell in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2009;114:5415-25.
49. Oancea C, Ruster B, Roos J, Ali Mian A, Micheilis T, Held H, Dubey A, Serve H, Henschler R, Ruthard M. T(15;17)-PML-RAR-induced leukemogenesis: long-term repopulating hematopoietic stem cells as the initial target and more mature progenitors as the potential targets for final leukemic transformation. *ASH Meeting Abstracts Blood* 2009;114, abstr 3980.
50. Pearce DJ, Taussig D, Zibara K, Smith LL, Ridler C, Preudhomme C, Young BD, Rohatiner AZ, Lister TA, Bonnet D. AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. *Blood* 2006;107:1166-73.
51. Feuring-Buske M, Gerhard B, Cashman J, Humphries RK, Eaves CJ, Hogge DE. Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in beta 2 microglobulin-deficient NOD/SCID mice in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors. *Leukemia* 2003;17:760-63.
52. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone marrow endosteal region. *Nature Biotechnol* 2007; 25:1315-21.
53. Sanchez PV, Perry RL, Sarry JE, Perl DE, Murphy K, Swider CR, Bagg A, Choi JK, Biegel JA, Danet-Demoyers D, Carroll M. A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2009;23:2109-17.
54. Nicolini FE, Cashman JD, Hogge DE, Humphries RK, Eaves CJ. NOD/SCID mice engineered to express human IL-3, GM-CSF and Steel factor constitutively mobilize engrafted human progenitors and compromise human stem cell regeneration. *Leukemia* 2004;18:341-47.
55. Wunderlich M, Chou FS, Link KA, Mirukawa B, Perry RL, Carroll M, Mulloy JC. AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. *Leukemia* 2010;24:1785-88.
56. Sarry JE, Murphy K, Perry R, Sanchez P, Secreto A, Keefer C, Swider C, Strelcecki AC, Cavelier C, Recher C, Mansat-De Mas V, Delabesse E, Danet-Desmoyers G, Carroll M. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID IL2R γ c-deficient mice. *J Clin Invest* 2011;21:384-95.
57. Goardon N, Marchi E, Alzberger A, Quek L, Schuh A, Soneji S, Wollp, Mead A, Alford KA, Rout R, Chaudhury S, Gilkes A, Krappner S, Bedjord K, Begum S, Geddes N, Griffiths M, Standen G, Stenberg A, Caevnagh J, Hunter H, Bowen D, Killick S, Robinson L, Price A, Macintyre E, Virgo p, Brunett A, Craddock C, Enver T, Jacobsen SE, Porcher C, Vyas P. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2011;19:138-52.

58. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, Akiyama T, Kuroda H, Kawano Y, Kobune M, Kato J, Hirayama Y, Sakamaki S, Kohda K, Miyake K, Niitsu Y. Interaction between leukemic cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nature Med* 2003;9:1158-65.
59. Krause DS, Lazarides K, von Adrian VH, Van Etten RA. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nature Med* 2006;12:1175-80.
60. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadjia-Joffe F, Dick JE. *Targeting* of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nature Med* 2006;12:1167-74.
61. Rombouts EJ, Pavic B, Lowenberg B, Ploemacher RE. Relation between CXCR4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;104:550-57.
62. Spoo AC, Lubbert M, Wierda WG, Burger JA. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2007;109:786-91.
63. Sipkins DA, Wie X, Wu JW, Runnels JM, Coté D, Means TK, Luster AD, Scadden DT, Lin CP. *In vivo* imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumor engraftment. *Nature* 2005;435:969-73.
64. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 2008;322(5909):1861-5.
65. Testa U, Riccioni R, Militi S, Coccia E, Stellacci E, Samoggia P, Latagliata R, Mariani G, Rossini A, Battistini A, Lo-Coco F, Peschle C. Elevated expression of IL-3R α in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood* 2002;100:2980-88.
66. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, Meyerrose T, Rossi R, Grimes B, Rizzieri DA, Luger Sm, Phillip GL. The interleukin-3 receptor alpha is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2000;14:1777-84.
67. Graf M, Hecht K, Reif S, Pelka-Fleischer R, Pfister K, Schmetzer H. Expression and prognostic value of hemopoietic cytokine receptors in acute myeloid leukemia (AML): implications for future therapeutical strategies. *Eur J Haematol* 2004;72:89-106.
68. Vazn Thenen A, Moshaver B, Kelder A, Iler N, Nieuwint AW, Zweegman S, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia* 2007;21:1700-07.
69. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, Guthridge MA, Thomas D, Barry EF, Boyd A, Gering DP, Vairo G, Lopez AF, Dick JE, Lock RB. Monoclonal antibody-mediated *targeting* of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;5:31-42.
70. Frankel AE, Ramage J, Kiser M, Alexander R, Kucera G, Miller MS. Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor. *Protein Engineering* 2000;13:575-81.
71. Testa U, Riccioni R, Biffoni M, Diverio D, Lo-Coco F, Foà R, Peschle C, Frankel AE. Diphtheria toxin fused to variant human interleukin-3 induces cytotoxicity of blasts from patients with acute myeloid leukemia according to the level of interleukin-3 receptor expression. *Blood* 2005;106:2527-29.
72. Du X, Ho M, Pasrtan I. New immunotoxins *targeting* CD123, a stem cell antigen on acute myeloid leukemia cells. *J of Immunotherapy* 2007;30:607-13.
73. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, van Rooijen N, Weissman IL. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 2009;138:286-99.

74. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, Traver D, van Rooijen N, Weissman IL. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 2009;138:271-85.
75. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Jan M, Tsukamoto R, Zhao F, Park CY, Weissman IL, Majeti R. Therapeutic antibody *targeting* of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2011;71:1374-84.
76. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh A, Gentles A, Volkmer J, Weiskopf K, Willingham S, Raveh T, Park CY, Majeti R, Weissman IL. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med* 2010;2:p63ra94.
77. Hosen N, Park C, Tatsumi N, Oji Y, Sugiyama H, Gramatzki M, Krensky AM, Weissman IL. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:11008-13.
78. Becker H, Marcucci G, Mahamy K, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, Whitman SP, Paschka P, Holland KB, Schwind S, Wu YZ, Powell BL, Carter TH, Kolitz J, Wetzler M, Carroll A, Baer M, Moore J, Caliguri M, Larson R, Bloomfield C. Mutations of the Wilms tumor 1 gene (WT1) in older patients with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *Blood* 2010;116:788-92.
79. Koeber W, Zhao X, Singh S, Pardoux C, Zhao J, Guzman ML, Sen S, Yonkovich S, Liu S, Zhan X, Tomasevic N, Zhou C, Gros D, Jordan CT, Gotlib J, His ED, Abo A. Monoclonal antibodies against IREM-1: potential for targeted therapy of AML. *Leukemia* 2009;23:1587-97.
80. Van Rhenen A, Van Dongen A, Kelder A, Rombouts E, Feller N, Moshaver B, Van Walsum MS, Zweegam S, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. The novel AML stem cell-associated CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood* 2007;110:2659-66.
81. Moshaver B, Van Rhenen A, Kelder A, Van der Pol M, Trewijn M, Bachas C, Westra A, Ossenkoppele G, Zweegman S, Schuurhuis GJ. Identification of a small subpopulation of candidate leukemia-initiating cells in the side population of patients with acute myeloid leukemia. *Stem Cells* 2008;26:3059-67.
82. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, Tomizawa-Murosawa M, Tanaka S, Takagi S, Uchida N, Suzuki N, Sone A, Najima Y, Ozawa H, Wake A, Taniguchi S, Shultze LD, Ohara O, Ishikawa F. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Science Transl Med* 2010;12:17ra19.
83. Riccioni R, Diverio D, Riti V, Buffolino S, Mariani G, Boe A, Cedrone M, Ottone T, Foà R, Testa U. Interleukin (IL)-3/granulocyte macrophage-colony stimulating factor/IL-5 receptor alpha and beta chains are preferentially expressed in acute myeloid leukemia with mutated FMS-related tyrosine kinase 3 receptor. *Brit J Haematol* 2009;144:376-87.
84. Riccioni R, Pelosi E, Riti V, Castelli G, Lo-Coco F, Testa U. Immunophenotypic features of acute myeloid leukemia patients exhibiting high FLT3 expression not associated with mutations. *Brit J Haematol* 2011;153:33-42.
85. Labbaye C, Spinello I, Quaranta MT, Pasquini L, Petrucci E, Biffoni M, Nuzzolo ER, Billi M, Foà R, Brunetti E, Grignani F, Testa U, Peschle C. A three-step *pathway* comprising PLZF/miR-146^c/CXCR4 controls megakaryopoiesis. *Nature Cell Biol* 2008;10:788-801.
86. Spinello I, Quaranta MT, Riccioni R, Riti V, Pasquini L, Boe A, Pelosi E, Vitale A, Foà R, Testa U, Labbaye C. MicroRNA-146 and AMD3100, two ways to control CXCR4 expression in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal* 2011;1(e26):1-10.
87. Riccioni R, Senese M, Diverio D, Riti V, Buffolijno S, Mariani G, Boe A, Cedrone M, Lo-Coco F, Foà R, Peschle C, Testa U. M4 and M5 acute myeloid leukemia display a high sensitivity to Bortezomib-mediated apoptosis. *Brit J Haematol* 2007;139:194-205.