

RUOLO DELL'IP OSSIA NELLA REGOLAZIONE DEI MICRORNAS E DEI GENI BERSAGLIO NELLA BIOLOGIA DEL CANCRO

Isabella Spinello, Maria Teresa Quaranta, Rosa Paolillo, Roberta Riccioni, Eleonora Petrucci, Ugo Testa, Catherine Labbaye
Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La vita aerobica si è evoluta in modo tale che la sopravvivenza dipende dall'ossigeno molecolare, per cui, quando si verificano cambiamenti che determinano un aumento o una diminuzione dell'ossigeno molecolare, rispettivamente iperossia e ipossia, l'organismo deve far fronte ad una crisi che conduce alla deplezione delle riserve energetiche, alterazioni dei segnali a cascata, stress ossidativo, morte cellulare e danno tissutale.

Per "normossia" si intende un livello di ossigeno sufficiente affinché avvengano i normali processi fisiologici all'interno di cellule, tessuti e/o organi (1). Nonostante siano state stabilite alcune linee guida, non ci sono valori di pressione parziale d'ossigeno (pO_2) assoluti per definire l'"ipossia". I livelli di ossigeno che dettano un cambiamento in senso ipossico cambiano a seconda del sistema (cellula/tessuto/organo) a cui si fa riferimento (1). In generale, nei sistemi cellulari una pO_2 pari o inferiore al 5% è indice di ipossia. Livelli di pO_2 compresi fra 5 e 2% corrispondono ad una condizione di ipossia moderata, mentre livelli $<2\%$ rappresentano una condizione di marcata ipossia.

Lo stato di ipossia viene generalmente associato a condizioni patologiche, come ischemia cerebrale, disturbi della risposta infiammatoria, diabete e tumori solidi, nei quali si osserva un'umentata proliferazione cellulare associata ad ipossia (1-3). Tuttavia condizioni di ipossia si osservano anche nei processi fisiologici normali, come durante lo sviluppo fetale, nella proliferazione e nel differenziamento cellulare, nei processi riparativi dei tessuti e nel tessuto ematopoietico (4). In alcuni tessuti esistono dei veri e propri gradienti di pO_2 , come ad esempio nel midollo osseo, per cui le cellule più vicine ai sinusoidi vasali sono esposte a pO_2 elevate intorno al 5-7%, mentre quelle presenti nei sito più lontani a livello dell'endostio sono esposte a livelli molto più bassi di pO_2 , fino a 0,1% (4). Le regioni endosteali sono ricche in cellule staminali emopoietiche (CSE) e la condizione fisiologica di ipossia risulta indispensabile per il mantenimento della staminalità di queste cellule.

Fluttuazioni nella concentrazione locale di ossigeno inducono il sistema, la cellula o l'organo, a mettere in atto strategie di adattamento che determinano protezione o limitazione del danno. In presenza di basse concentrazioni di ossigeno, la cellula reagisce con una serie di risposte coordinate volte a ripristinare i livelli ideali di O_2 (5, 6). Una delle risposte a livello molecolare consiste nell'attivazione di fattori di trascrizione specifici, o inducibili da ipossia, chiamati HIF (*Hypoxia Inducible Factors*) (5).

I fattori HIF sono dei complessi etero-dimerici composti da una subunità α , la cui stabilità è ossigeno-dipendente, e una subunità β ossigeno-indipendente. Sono state identificate tre subunità α (1α , 2α e 3α) e una subunità β (detta anche ARNT, *Aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator*), che però presenta diverse varianti di *splicing* (5, 6).

In condizioni di normossia, nel citoplasma, le subunità α subiscono due eventi di idrossilazione catalizzati dagli enzimi PHDs (*prolyl hydroxylase domain proteins*) e FIH (*factor inhibiting HIF*), che ne provocano la degradazione mediata da proteosoma (5). In condizioni di ipossia, gli enzimi PHDs e FIH sono inattivi a causa della mancanza dell'ossigeno necessario alle reazioni di idrossilazione. In tal modo la subunità α è stabilizzata, e trasloca nel nucleo per legarsi alla subunità β , formando un eterodimero (HIF α /HIF β) che rappresenta la forma attiva di HIF, in grado di funzionare da fattore di trascrizione. I fattori HIF identificati (HIF1 α /HIF β , HIF2 α /HIF β , HIF3 α /HIF β) diventano attivi e dunque funzionali in condizioni di ipossia. Tuttavia, oltre allo stress ipossico, esistono altre condizioni che promuovono l'attività trascrizionale di HIF, come, per esempio, la stimolazione autocrina tramite i fattori di crescita, o la perdita di funzioni onco-soppressive e l'acquisto di funzioni oncogeniche (5, 6). L'eterodimero HIF α /HIF β (HIF) si lega a una regione del DNA, dalla sequenza nucleotidica consensus identificata (5'-RCGTG-3'), chiamata HRE (*Hypoxia Response Element*, o sito di legame HIF), presente nei promotori dei geni inducibili da ipossia (7).

Inizialmente, HIF è stato descritto come un attivatore della trascrizione di più di 60 geni noti (7) come, per esempio, il VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*) che induce le cellule dell'endotelio a migrare verso aree ipossiche e promuove la crescita dei vasi sanguigni (7, 8), o il CXCR4, il recettore delle chemochine di tipo 4, coinvolto nella formazione delle metastasi tumorali (9) e nella megacariopoiesi (10), o ancora i geni coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi biologica, nell'apoptosi ecc. (2-6). Successivamente, HIF è stato descritto anche come repressore della trascrizione genica (11).

Studi recenti hanno permesso l'identificazione di alcuni microRNA (miRNA; piccoli RNA non codificanti e regolatori a livello post-trascrizionale dell'espressione di geni bersaglio) inducibili da ipossia (HRM, *hypoxia-regulated microRNAs*). Questi HRM risultano spesso attivati in diversi tipi di tumori, come quello della mammella e del colon, suggerendo un loro ruolo nella tumorigenesi (12). Fra i HRM, il miRNA-210, la cui espressione viene chiaramente indotta dall'ipossia, ha come bersagli molti miRNAs che codificano per proteine che svolgono un ruolo chiave nel controllo della proliferazione, nel DNA- e RNA- *binding* e riparo, nella differenziazione, nel sviluppo ed l'apoptosi (13). Inoltre, miRNA-210 è fortemente sovraespresso in molti tumori (13).

Che in generale, i miRNAs siano direttamente coinvolti nella formazione di tumori e leucemie è stato dimostrato da numerosi studi (12-16); nelle leucemie, sono stati identificati diversi miRNAs espressi in maniera specifica e differenziale nei sottogruppi più comuni delle leucemie acute mieloidi (LAM) (14, 15), mentre geni codificanti per i miRNAs sono stati identificati e localizzati in siti fragili e/o in regioni del DNA soggette alle rotture che danno luogo a traslocazione cromosomica (15). Il 6% dei miRNAs umani presenta a livello del loro DNA dei siti HRE putativi, indicando questi miRNAs come possibili bersagli di HIF e suggerendo la possibilità di un loro ruolo associato all'ipossia.

L'ipossia, che è stata studiata soprattutto nei tumori solidi dove è direttamente coinvolta nel fenomeno di mobilitazione delle cellule tumorali, ovvero nella metastatizzazione, ha un profondo impatto sul metabolismo cellulare e sulla trascrizione e influenza il profilo dei network che coinvolgono i recettori di citochine e chemochine, come per esempio CXCR4 e il suo ligando, SDF-1 α . L'asse CXCR4/SDF-1 α è coinvolto nella disseminazione metastatica e nella crescita e sviluppo delle cellule cancerose (16), comprese quelle leucemiche (17). Regioni di ipossia si trovano nei tessuti in attiva proliferazione, come i tumori solidi, dove le cellule tumorali localizzate in aree ipossiche sono caratterizzate da un'alta espressione di CXCR4 (18). Tali circostanze rappresentano, assieme all'ipossia, un fattore di prognosi negativa e favorisce lo sviluppo di metastasi nei tumori solidi e nelle leucemie (17, 18). Benché gli alti livelli di espressione di CXCR4 siano anche correlati a prognosi negativa, l'impatto di una ridotta pO₂

sull'espressione e sulla funzione biologica di CXCR4 nelle leucemie, specialmente nelle LAM (17) è a tutt'oggi oggetto di studio e non è chiaro se gli elevati livelli di CXCR4 osservati in alcune LAM siano riconducibili a meccanismi molecolari innescati dall'ipossia o da meccanismi indipendenti dall'ipossia.

Accanto alla fisiopatologia, l'ipossia ha anche un ruolo nella funzione dei tessuti normali. Nel midollo osseo, le CSE risiedono in domini microambientali ben definiti chiamati "nicchie", dove le CSE sono mantenute in uno stato "quiescente" per via di un microambiente specializzato, a bassa concentrazione di ossigeno, cioè in condizione di ipossia. Il midollo osseo sembra essere l'unico tra i tessuti normali a trovarsi fisiologicamente in condizioni di ipossia (19). All'interno del midollo, esisterebbero delle regioni anossiche (ovvero del tutto prive di O₂) per proteggere le CSE dai danni causati dai radicali liberi dell'ossigeno (20). Le CSE nel midollo sarebbero inoltre organizzate in maniera dipendente dal gradiente di ossigeno: da una quantità maggiore di CSE all'interno del midollo, nelle zone ad ossigenazione più bassa (ipossia), si passa a quantità di CSE drasticamente minori nelle zone più "superficiali" man mano che l'ossigenazione aumenta (19).

Le cellule che formano la nicchia (cellule stromali ed endoteliali del midollo osseo) rilasciano dei segnali paracrini, che permettono alla CSE che li riceve di uscire o meno dal suo stato di "quiescenza", e di scegliere tra auto-rinnovamento e differenziazione cellulare. Ad esempio, l'ipossia modula il rilascio di alcuni fattori di crescita da parte delle cellule stromali ed, in particolare, stimola la produzione di VEGF e diminuisce quella di SDF-1 α e, tramite questo e altri meccanismi, modula lo stato di quiescenza e la migrazione delle cellule staminali e dei progenitori emopoietici (21). Le CSE sono caratterizzate a livello funzionale dalla loro capacità di migrare e ripopolare il midollo osseo di un ospite trapiantato (22). In questo fenomeno, l'interazione tra le CSE e la nicchia è molto importante, in quanto il successo di un trapianto dipende dalla capacità delle CSE di mobilizzarsi e "circolare" per quindi colonizzare (*homing*) una nicchia appropriata.

L'ipossia quindi emerge come una componente importante del microambiente delle cellule tumorali e leucemiche, ma anche delle cellule normali, come le CSE.

L'ipossia, che nei tumori maligni è coinvolta nella sopravvivenza delle cellule tumorali, potrebbe influenzare anche il fenomeno del cannibalismo (23). Il cannibalismo è sempre più studiato nell'ambito dei tumori solidi, dove viene "attivato" in situazioni di depressione cellulare e vede coinvolto, almeno nei melanomi (24), il gene TM9SF4 (*transmembrane 9 superfamily protein member 4*) (24), recentemente trovato sovraespresso in un sottotipo di LAM e nelle sindromi mielodisplastiche (MDS) caratterizzate dall'amplificazione di un frammento del cromosoma 20 (20q11.21) contenente l'intero gene TM9SF4 (25). Queste osservazioni supportano l'idea di un eventuale effetto oncogenico di questo gene, la cui funzione sia nei tumori solidi che nelle leucemie deve essere ancora identificata.

Poiché la risposta cellulare all'ipossia prevede l'attivazione di diversi regolatori trascrizionali coinvolti nell'infiammazione, nell'invasione tumorale, nell'angiogenesi, nel blocco del ciclo cellulare e nell'apoptosi, una migliore comprensione di tutti questi meccanismi strettamente correlati, così come l'identificazione di nuovi geni e/o miRNAs sensibili all'ipossia, dovrebbe rivelarsi fruttuosa nella ricerca di nuovi bersagli terapeutici e nella ricerca di nuove e più efficaci terapie anti-tumorali.

Quest'anno, abbiamo dunque focalizzato la nostra ricerca sullo studio dell'impatto dell'ipossia sull'espressione, la regolazione e la funzione biologica di specifici miRNAs, miR-146a e miR-145, e geni bersaglio, CXCR4 per miR-146a (10) e TM9SF4 eventualmente per miR-145, nelle patologie correlate all'ipossia, in particolare nelle LAM e nel tumore della mammella.

Stato di sviluppo

Sia nei tumori solidi sia nelle LAM, il livello di espressione molto elevato del CXCR4 esposto sulle membrane delle cellule tumorali o dei blasti leucemici rappresenta uno dei marcatori di prognosi negativa associata ad alta probabilità di ricaduta e scarsa sopravvivenza. L'alta espressione del CXCR4 è direttamente coinvolta nel fenomeno della chemioresistenza e della ripresa di malattia spesso osservate, sia nei tumori solidi che nelle LAM.

La scoperta di inibitori specifici per CXCR4 rappresenta un obiettivo importante della farmacologia molecolare. Attualmente, un inibitore molecolare chiamato AMD3100 viene utilizzato per bloccare la funzione di CXCR4. L'AMD3100 è un antagonista di SDF-1 α e permette di mobilizzare le cellule staminali ematopoietiche dal midollo osseo verso il sangue periferico (26), e di bloccare la proliferazione e le metastasi dei tumori sviluppati nei modelli animali sperimentali.

Il nostro gruppo ha in precedenza dimostrato il ruolo del CXCR4 durante la proliferazione e la differenziazione megacariocitaria, e identificato CXCR4 come un gene bersaglio diretto del miR146a nelle cellule megacariocitiche (Mk) normali come nelle leucemie (10). È stato poi identificato un nuovo circuito regolatorio della megacariopoiesi, PLZF/miR-146a/CXCR4, in cui CXCR4 è controllato al livello post- trascrizionale dal miR-146a, mentre miR-146a è a sua volta regolato dal fattore di trascrizione PLZF (*PromyeLocytic Zinc Finger*), un repressore del miR-146a nelle cellule megacariocitiche (10).

L'inibizione della traduzione della proteina CXCR4 da parte di miR-146a rappresenta un nuovo metodo per bloccare CXCR4 nelle cellule tumorali e leucemiche. Recentemente, abbiamo dimostrato che miR-146a e AMD3100, con meccanismi diversi, abbassano i livelli di espressione della proteina CXCR4, bloccano la proliferazione delle cellule leucemiche e possono essere utilizzati in combinazione con dei terapeutici anti-leucemici, nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche (27).

Poiché un basso livello del miR-146a è correlato ad una elevata espressione di CXCR4 in LAM, in particolare del tipo monocita rio (LAM M5) (19), la modulazione del miR-146a, come recentemente indicato nei tumori solidi, per esempio nel tumore della mammella (28), rappresenta una potenziale strategia terapeutica, insieme all'uso degli inibitori di CXCR4, per aumentare la risposta delle cellule leucemiche ai trattamenti con farmaci antitumorali standard.

Infine, CXCR4 è un gene indotto dall'ipossia nelle cellule tumorali e leucemiche (17-19). Recentemente, un numero crescente di droghe che inibiscono i fattori HIF indotti dalla risposta all'ipossia sono state identificate e testate come agenti chemioterapici (29). È dunque importante identificare i tumori e/o le leucemie nelle quali HIF-1 α , in particolare, può giocare un ruolo critico. Abbiamo dunque analizzato l'effetto dell'ipossia sull'espressione e la regolazione sia del miR-146a che di CXCR4 nei modelli cellulari per le leucemie e per il tumore della mammella. I nostri dati indicano che il *pathway* regolatorio che coinvolge l'asse miR-146a/CXCR4 risponde all'ipossia e il miR-146a è un nuovo HRM, bersaglio diretto del fattore HIF-1 α nelle cellule leucemiche, ma del fattore HIF-2 α nelle cellule ematopoietiche normali (manoscritto in preparazione). Poiché HIF-1 α e HIF-2 α riconoscono e legano la stessa sequenza di DNA, quali siano i target specifici dell'uno o dell'altro fattore è ancora da stabilire con certezza. I nostri dati indicano che il fenotipo, normale o tumorale, può essere determinante per il legame con i fattori HIF, che rappresentano a loro volta potenziali bersagli terapeutici.

Il gene TM9SF4 è coinvolto nel cannibalismo cellulare, fenomeno simile alla fagocitosi che sembra essere cruciale per la sopravvivenza dei tumori in condizioni di carenza di nutrienti e ipossia. La presenza di cellule cannibali è stata correlata a prognosi negativa in numerosi tumori umani di diversa istologia, come ad esempio il tumore della mammella, il medulloblastoma e le neoplasie del sangue (24-26). Recentemente, l'mRNA di TM9SF4 è stato trovato sovraespresso

in un sottotipo di LAM e nelle sindromi mielodisplastiche (MDS) caratterizzate dall'amplificazione di un frammento del cromosoma 20 (20q11.21) contenente l'intero gene TM9SF4, in accordo con l'idea di un eventuale effetto oncogenico di questo gene mediato da amplificazione genica (26).

Analizzando l'espressione di TM9SF4 in cellule leucemiche e nel tumore della mammella, abbiamo trovato che TM9SF4 risponde all'ipossia e potrebbe essere un bersaglio del miRNA-145 (miR-145), precedentemente trovato sovraespresso in queste stesse cellule (30). Poiché non si conoscono la regolazione e la funzione di TM9SF4 né nelle leucemie né nel sistema ematopoietico normale, così come non si conosce nella patologia del tumore della mammella, il nostro studio sta procedendo utilizzando cellule mantenute in condizione di ipossia, a paragone di quelle mantenute in condizioni di normossia (manoscritto in preparazione).

Conclusioni e prospettive future

I nostri studi hanno dimostrato che il miR-146a è un regolatore dell'espressione del CXCR4 e che può, insieme a un inibitore specifico, l'AMD3100, essere utilizzato per inibire la funzione del CXCR4, sovraespresso nei tumori e nelle leucemie, in combinazione ad dei trattamenti a base di chemioterapici. Il trattamento combinato, in particolare, aumenta la sensibilità delle cellule tumorali o leucemiche al chemioterapico, diminuendo il fenomeno della resistenza e dunque della possibilità di ricaduta spesso osservata nei trattamenti classici con solo chemioterapici. Lo studio dell'effetto dell'ipossia sulla regolazione del miR-146a/CXCR4 nelle cellule leucemiche e del tumore della mammella è in corso, così come i trattamenti con miR-146a, AMD3100, anti-HIF, per valutarne l'efficacia in caso di ipossia, insieme o meno ad altri trattamenti chemioterapici.

TM9SF4 è un nuovo gene che risponde all'ipossia sia nelle cellule tumorali che leucemiche e che rappresenta un nuovo bersaglio terapeutico.

Il nostro studio sul ruolo dell'ipossia nella regolazione dei microRNAs, miR-146a e miR-145, e dei loro geni bersaglio CXCR4 e TM9SF4, permetterà di valutare se miR-146a/CXCR4 e miR-145/TM9SF4, possano rappresentare dei potenziali bersagli terapeutici, in particolare nelle patogenesi correlate all'ipossia, come nelle LAM e nel tumore della mammella.

Il nostro progetto rappresenta una prima tappa nella ricerca, indispensabile per lo sviluppo di modelli preclinici necessari per la valutazione e la definizione di nuove strategie di ricerca traslazionale, con lo scopo di sviluppare nuove terapie antitumorali sicure ed efficaci.

Capire il *signaling network* e il ruolo dei fattori HIF attivati dall'ipossia nella biologia del cancro è indispensabile per disegnare nuove terapie, così come è importante identificare sia i geni che i miRNAs che rispondono all'ipossia, e dunque ad una regolazione tramite HIF. Nuove droghe anti-HIF sono state identificate; nel prossimo futuro l'attività del nostro gruppo sarà incentrata su (i) verificare le patologie nelle quali HIF, HIF-1 α in particolare, può avere un ruolo critico; (ii) identificare le combinazioni di trattamenti che abbiano degli effetti sinergici (usare i miRNA stessi (31), gli inibitori specifici come AMD3100 per bloccare CXCR4 (26), i chemioterapici noti (20), le molecole anti-HIF (29)); (iii) valutare, in esperimenti *in vitro*, gli effetti dei diversi trattamenti sulla biologia del cancro, analizzando la proliferazione tumorale, la vascolarizzazione e altri parametri biologici fondamentali.

Bibliografia

1. Kulkarni AC, Kuppusamy P, Parinaldi N. Ossigeno, attore protagonista del dramma fisiopatologico: meccanismi della trinità, normossia, ipossia, e iperossia nelle malattie e in terapia. *Antioss e Mecc Regolatori Redox* 2007;9:10.
2. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:967-75.
3. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2009;29(5):625-34.
4. Guitart AV, Hammoud M, Dello Sbarba P, Ivanovic Z, Praliron V. Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. *Exp Hematol* 2010;38:847-51.
5. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. HIF at a glance. *J of Cell Scien* 2009;122(8):1055-57.
6. Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci* 2007;32(8):389-97.
7. Kenneth NS, Rocha S. Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochem J* 2008;414(1):19-29.
8. Semenza GL. *Targeting* HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
9. Rankin EB, Giacca AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death and Diff* 2008;15(4):678-85.
10. Labbaye C, Spinello I, Quaranta MT, Pelosi E, 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-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. *Nat Cell Biol* 2008;10(7):788-801.
11. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005;105:659-69.
12. Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA and Ivan M. A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death and Diff* 2008;15:667-71.
13. Chan SY, Loscalzo J. MicroRNA-210, a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle* 2010;9:1072-83.
14. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(9):2999-3004.
15. Li Z, Lu J, Sun M, Mi S, Zhang H, Luo RT, Chen P, Wang Y, Yan M, Qian Z, Neilly MB, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Zhang DE, Larson RA, Le Beau MM, Thirman MJ, Golub TR, Rowley JD, Chen J. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(40):15535-540.
16. Pelosi E, Labbaye C, Testa U. MicroRNAs in normal and malignant myelopoiesis. *Leukemia Res* 2009;33:1584-93.
17. Fiegl M, Samudio I, Clise-Dwyer K, Burks JK, Mnjoyan Z, Andreeff M. CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure. *Blood* 2009;113(7):1504-12.
18. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006;107:1761-67.
19. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(13):431-36.

20. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* 2001;81:685-96.
21. Jing D, Wobus M, Poitz D, Bashauer M, Ehninger G, Odermann R. Oxygen tension plays a critical role in the hematopoietic microenvironment *in vitro*. *Haematologica* 2012;97(3):331-9.
22. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cell. *The American Journal of Pathology* 2006;169(2):338-45.
23. Fais S. Cannibalism: a way to feed on metastatic tumors. *Cancer Letters* 2007;258:155-64.
24. Lozupone F, Perdicchio M, Brambilla D, Borghi M, Meschini M, Barca S, Marino ML, Logozzi M, Federici C, Iessi E, de Milito A, Fais S. The human homologue of Dictyostelium discoideum phg1A is expressed by human metastatic melanoma cells. *EMBO reports* 2009;10(12):1348-54.
25. Mackinnon RN, Selan C, Wall M, Baker E, Nandurkar H, Campbell LJ. The Paradox of 20q11.21 Amplification in a Subset of Cases of Myeloid Malignancy with Chromosome 20 Deletion. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49(11):998-1013.
26. Bonig H, Chudziak D, Priestley G, Papayannopoulou T. Insights into the biology of mobilized hematopoietic stem/progenitor cells through innovative treatment schedules of the CXCR4 antagonist AMD3100. *Exp Hematol* 2009;37:402-15.
27. Spinello I, Quaranta MT, Riccioni R, Riti V, Pasquini L, Boe A, Pelosi E, Vitale A, Foà R, Testa U, Labbaye C. MicroRNA-146a and AMD3100, two ways to control CXCR4 expression in Acute Myeloid Leukemias. *Blood Cancer J* 2011;1(e26):1-10.
28. Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2009;69:1279-83.
29. Moret V, Laras Y, Cresteil T, Aubert G, Ping DQ, Di C, Barthélémy-Requin M, Béclin C, Peyrot V, Allegro D, Rolland A, De Angelis F, Gatti E, Pierre P, Pasquini L, Petrucci E, Testa U, Kraus JL. Discovery of a new family of bis-8-hydroxyquinoline substituted benzylamines with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis, structure-activity relationship, and action mechanism studies. *Eur J Med Chem* 2009;44(2):558-67.
30. Sachdeva M, Mo YY. MicroRNA-145 Suppresses CELL INVASION AND METASTASIS BY DIRECTLY TARGETING MUCIN 1. *Cancer Res* 2010;70(1):378-87.
31. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438(7068):685-89.