



Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della
Ricerca



Università degli Studi
di Palermo

Dottorato di Ricerca in Immunofarmacologia

XX ciclo: 2006-2008

Coordinatore: Prof. Francesco Dieli

SURVIVINA E INDUZIONE DELL'APOPTOSI

Tesi di dottorato:

Dottoranda Anna Barbara Di Stefano

Tutor:

Prof. Giorgio Stassi

Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche

1. Introduzione	
2. Apoptosi	pag.4
Via intrinseca	
Via estrinseca	
3. Iap	pag.7
Survivina	
Ruolo della survivina	
Survivina e neoplasie	
4. Cellule staminali	pag.14
Cellule staminali embrionali	
Cellule staminali fetali	
Cellule staminali adulte	
Progenitori cellulari	
5. Chemioterapia	pag.18
6. Citochine	pag.20
IL4	
7. Obiettivo dello studio	pag.22
8. Materiali e Metodi	pag.25
9. Risultati	pag.30
10. Discussione	pag.39
11. Bibliografia	pag.44

INTRODUZIONE

Il cancro al colon retto è il terzo tumore viscerale più comune negli uomini e nelle donne. La sua incidenza è in aumento in tutto il mondo, in Europa vengono diagnosticati ogni anno 200.000 casi, negli USA ci sono circa 130.000 casi ogni anno, e 50.000 i decessi.

È ampiamente accettato che i tumori sono costituiti da un insieme di popolazioni cellulari con diverse proprietà biologiche, quali: proliferazione, migrazione, resistenza ai farmaci. Tale eterogeneità è stata sinora imputata al progressivo accumulo di mutazioni genetiche casuali nelle cellule tumorali. Secondo il vecchio modello, ogni cellula tumorale possiede capacità tumorigenica ed è quindi in grado di iniziare e sostenere la crescita tumorale. Oggi, tuttavia, questo modello risulta superato. Recentemente si è dimostrato che esiste, all'interno della massa neoplastica, una frazione numericamente esigua di cellule che è la sola responsabile della formazione e dello sviluppo del tumore. In base a queste ed altre evidenze sperimentali si è così giunti a ritenere che il tumore origini da una cellula staminale adulta, anziché da una qualsiasi cellula somatica; dunque, la neoplasia viene ad essere considerata un'organogenesi aberrante originata e sostenuta dall'accumulo di alterazioni, sia genetiche che epigenetiche, a carico delle cellule staminali normali o delle cellule progenitrici che acquisiscono proprietà tipiche delle cellule staminali tumorali. Tali cellule possiedono le caratteristiche proprie di cellule staminali, quali: l'autorinnovamento, lo stato indifferenziato, la multipotenzialità (ovvero la capacità di generare cellule mature appartenenti a diversi stipi cellulari).

Nel colon, è oggi ampiamente dimostrato che una piccola percentuale di cellule staminali normali risiedono in prossimità della base della cripta. Nei tumori, con una tipica disorganizzazione cellulare, è possibile isolare le cellule staminali tumorali ad opera di marcatori specifici di membrana. Recentemente, due differenti gruppi di ricerca hanno identificato una sottopopolazione di cellule esprimenti l'antigene di membrana CD133, o

prominina-1 [1, 2]. Si tratta di una glicoproteina caratterizzata da 5 domini trans-membrana e da 2 grandi eliche extracellulari glicosilate. E' stata inizialmente isolata sulla membrana delle cellule staminali ematopoietiche mentre adesso è considerato un valido marcatore specifico per le cellule staminali tumorali non solo di colon ma anche di cervello, prostata, melanoma e pancreas. Le cellule staminali tumorali rappresentano oggi il più importante materiale di studio per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche in grado di migliorare la prognosi dei pazienti affetti da tumore ed inoltre recenti indagini sperimentali indicano che queste cellule sono responsabili della comparsa della malattia minima residua in seguito a trattamento chemioterapico e alla formazione di metastasi. Tali cellule infatti riuscirebbero a sopravvivere agli stimoli di morte grazie ad un'elevata espressione degli ABC transporters, alla capacità di riparare il DNA, alla scarsa capacità di dividersi e alla presenza di elevati livelli di proteine anti-apoptotiche. In particolar modo nei tumori al colon, è stata riscontrata un'elevata espressione di una molecola anti-apoptotica quale la survivina. Membro della famiglia delle proteine inibitori dell'apoptosi (IAP) sembra essere associata alla progressione clinica tumorale e alla sopravvivenza delle cellule staminali, che guidano il processo di rinnovo. Essa è coinvolta sia nel controllo della divisione cellulare che nell'inibizione dell'apoptosi [3]. Numerosi lavori hanno mostrato che la survivina potrebbe rappresentare un valido "marker" tumorale in quanto è espressa ad elevati livelli nelle cellule tumorali ed assente nelle cellule sane, fatta eccezione delle cellule basali del colon, endoteliali e del timo.

APOPTOSI

L'Apoptosi, o morte programmata, rappresenta un meccanismo fisiologico per il mantenimento dell'omeostasi tissutale. La cellula apoptotica si stacca dalle cellule vicine, mostrando una contrazione dell'intero corpo cellulare, la condensazione e la frammentazione del nucleo, formando dei corpi apoptotici, questi vengono riconosciuti dalle cellule vicine che

ne operano la fagocitosi.

Molte sono le molecole coinvolte nella regolazione dell'apoptosi, tra queste una famiglia di cistein-proteasi, denominate caspasi, gioca sicuramente un ruolo centrale. Finora sono stati trovati 14 differenti tipi di caspasi umane, alcune delle quali sono coinvolte nel processo di attivazione delle caspasi stesse, altre sono responsabili della morte cellulare. Ci sono due tipi di caspasi: le caspasi "iniziatrici" (caspasi-2, -8, -9, -10) che tagliano pre-forme inattive di altre caspasi dette "effettrici" (caspasi-3, -6, -7) attivandole; le *caspasi effettrici* a loro volta taglieranno precisi substrati proteici dando corso al processo apoptotico.

Dopo l'attivazione proteolitica dalla loro forma di proenzima, le caspasi digeriscono varie protiene come la laminina, la polimerasi poliADP ribosio, proteine dell'apparato mitotico nucleare e proteine regolatrici dell'actina. La trasmissione del segnale apoptotico avviene attraverso due vie alternative definite una "intrinseca" e l'altra "estrinseca", che si intersecano a livello mitocondriale e portano entrambe all'attivazione di caspasi responsabili delle trasformazioni biochimiche e morfologiche caratteristiche dell'apoptosi.

La via intrinseca

Una grande varietà di stimoli come lo stress ossidativo, agenti alchilanti o radiazioni ionizzanti possono attivare la via intrinseca determinando il rilascio nel citoplasma di mediatori apoptotici quali il citocromo-c e Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct Inhibitor of Apoptotic protein Binding with Low isoionic point) la cui funzione è quella di contrastare l'effetto inibitorio delle proteine della famiglia delle IAP. La via intrinseca, o mitocondriale, è regolata dai membri della famiglia di Bcl-2, un gruppo di proteine in grado di controllare il rilascio dei fattori pro-apoptotici nel citoplasma. Questa famiglia genica include sia membri anti-apototici sia membri pro-apoptotici che contengono uno o più domini BH (Bcl-2 Homology). I prototipi dei membri anti-apoptotici di

questa famiglia sono Bcl-2 e Bcl-xL, mentre quelli dei membri pro-apototici sono Bax e Bad. A differenza dei primi due, che sono prevalentemente localizzati a livello della membrana mitocondriale esterna, del reticolo endoplasmatico o della membrana perinucleare, Bax e Bad sono in continuo movimento tra il citoplasma e gli organelli cellulari. La componente citosolica di queste proteine rappresenta la frazione inattiva, ma, in risposta a segnali pro-apototici, queste proteine si dirigono verso il mitocondrio dove si localizzano per favorire il rilascio del citocromo-c e la progressione del processo apoptotico. L'attivazione dei membri pro-apoptotici si verifica principalmente attraverso i meccanismi della fosforilazione e della proteolisi. Il rilascio del citocromo-c determina la formazione di un complesso ad alto peso molecolare detto "apoptosoma" che contiene oltre al citocromo-c, la proteina citosolica Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) e la pro-caspasi 9, componenti essenziali del macchinario di morte cellulare programmata. A livello dell'apoptosoma avviene inizialmente l'attivazione della caspasi 9 e successivamente viene attivata la caspasi 3, principale responsabile della fase esecutrice del processo apoptotico. L'attivazione della caspasi 3 è antagonizzata dalle IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein), le quali a sua volta sono antagonizzate da SMAC rilasciato dal mitocondrio.

La via estrinseca

La via estrinseca è mediata dall'attivazione dei recettori di morte, molecole appartenenti alla famiglia del recettore del Fattore di Necrosi Tumorale (TNFR, Tumor Necrosis Factor Receptor). CD95 (APO-1/Fas), il prototipo dei recettori di morte, è espresso sulla superficie cellulare come omotrimerico e presenta un dominio di 80 aminoacidi detto dominio di morte (DD, Death Domain), nella porzione intracitoplasmica. Quando il recettore trimerico interagisce con il ligando (CD95L), diventa competente per la formazione del complesso di trasduzione del segnale, il DISC (Death Inducing Signaling Complex). Nel DISC, la molecola

adattatrice FADD (Fas-associated DD containing protein) viene reclutata attraverso l'interazione omotipica del suo DD con quello di CD95. Oltre al dominio DD, FADD presenta un altro dominio di interazione proteina-proteina, il dominio effettore di morte, DED (Death Effector Domain). Tale dominio è necessario per l'interazione con il dominio DED di caspasi 8 che viene così reclutata nel DISC. FADD e caspasi 8 sono i componenti chiave della trasduzione del segnale di morte. Caspasi 8 risiede principalmente nel citoplasma come zimogeno, ma, in seguito al legame con FADD nel DISC, l'elevata concentrazione locale dell'enzima determina la sua autoattivazione. La forma attiva dell'enzima viene rilasciata nel citoplasma dove processa ed attiva caspasi 3, il principale effettore del processo apoptotico. Caspasi 3, direttamente o indirettamente attraverso l'attivazione proteolica di altre caspasi, è responsabile del taglio di una serie di substrati citoplasmatici e nucleari che conduce alla degradazione internucleosomale del DNA ed allo smantellamento ordinato delle strutture cellulari. La forma attiva di caspasi 8 è inoltre responsabile del taglio proteolitico della proteina BID che trasloca nei mitocondri provocando una ulteriore amplificazione del segnale apoptotico. L'apoptosi indotta dalla stimolazione dei recettori di morte, può essere ridotta o neutralizzata dalla presenza di proteine ad attività anti-apoptotica capaci di interferire con la trasduzione del segnale a livello del DISC. Una di queste proteine, FLIP (FLICE-Like Inhibitory Protein), è espressa in due isoforme e interagiscono, attraverso il dominio DED, con FADD e caspasi 8 bloccando il legame di quest'ultima al DISC e conseguentemente alla sua attivazione.

IAP

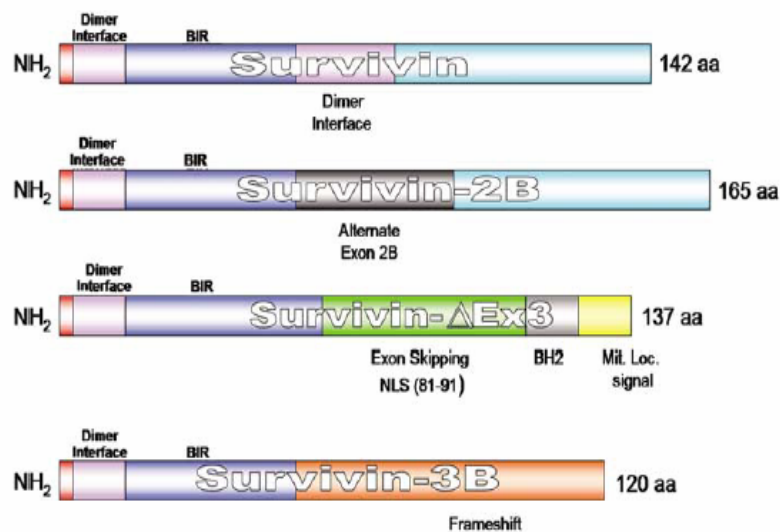
Le IAPs rappresentano un gruppo di proteine, appartenenti ad un'unica famiglia, ritrovate in maniera ubiquitaria dai virus alle cellule umane. Tali proteine regolano l'apoptosi inibendo le caspasi. I primi membri di questa famiglia ad essere individuati sono state le proteine Cp-IAP

e Op-IAP identificate, rispettivamente nel 1993 e nel 1994 nel Baculovirus, per la loro capacità di legare ed inibire le caspasi. Queste proteine presentano due motivi definiti: il primo è il motivo BIR (Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat) costituito da circa 80 amminoacidi, con un sito di fosforilazione serina-treonina seguito a valle nella regione C-terminale da 17 residui contenenti una glicina invariante; il secondo motivo, ritrovato nella porzione C-terminale, è il RING (Really Interesting New Gene) zinc finger. Questo motivo, solitamente localizzato nella porzione terminale, è stato ritrovato in un elevato numero di proteine ed è coinvolto nell'interazione con il DNA o con altre proteine. La presenza del motivo RING zinc finger sembra avere un ruolo critico nella funzione antiapoptotica delle IAPs nel Baculovirus. Successivamente nel 1995 sono state scoperte cinque proteine IAPs nell'uomo (X-IAP, c-IAP-1, c-IAP-2, NAIP e la survivina) e due in *Drosophila*, anch'esse con la capacità di inibire l'apoptosi. Le X-IAP, c-IAP-1, c-IAP-2, contengono ciascuna tre domini ripetuti di circa 70 amminoacidi denominati BIR (Cys/His Baculovirus IAP Repeat), un dominio RING zinc finger nella porzione C-terminale, la porzione tra il motivo BIR e il motivo RING risulta più lungo di quello ritrovato nel Baculovirus, le c-IAP-1 e c-IAP-2 possiedono inoltre un dominio detto CARD (CAspase Recruitment Domain). Questo dominio è composto da sei catene ad α -elica ed è comunemente ritrovato in queste proteine coinvolte nel segnale apoptotico.

Survivina

La Survivina è la più piccola delle IAPs; strutturalmente è caratterizzata da un singolo modulo BIR localizzato nella regione N-terminale e manca all'estremità del carbossi-terminale del dominio RING zinc finger e del dominio CARD, possiede invece un motivo ad α -elica all'estremità COOH-terminale e una inserzione di tre residui aminoacidici nel dominio BIR assenti nelle altre IAPs.

Il gene della Survivina è costituito da 14.796 nucleotidi ed occupa circa 14.7 Kb nel locus 17q25 nel genoma umano, comprendendo tre introni e quattro esoni, che codificano per 142 amminoacidi; il gene umano presenta un'elevata omologia con quello del topo, sebbene quest'ultimo è localizzato nel cromosoma 11 e codifica per una proteina di 140 amminoacidi. In aggiunta al trascritto della survivina wild-type originariamente identificato, sono state trovate altre tre isoforme; la survivina-2B generata dall'inserzione dell'esone 2; la survivina- Δ Ex3 data dalla rimozione dell'esone 3 e l'isoforma 3B che possiede un esone aggiuntivo, il 3B, derivato da una porzione dell'introne 3. Il trascritto Δ Ex3 codifica per una proteina di 137 amminoacidi (15,7 kDa); quello della survivina-2B per una proteina di 165 amminoacidi (18,6 kDa) e la -3B, avendo acquisito un nuovo codone di stop, codifica per una proteina tronca di 120 amminoacidi (13,8 kDa) [4].



La survivina è funzionale in forma omodimerica e la fosforilazione sul sito treonina in posizione 34 (Thr34) sembra essere indispensabile per lo svolgimento dell'azione antiapoptotica della proteina [5, 6]. Tale fosforilazione avviene grazie alla chinasi ciclina dipendente cdc2, la sola chinasi conosciuta abile a fosforilare la survivina e a colocalizzarsi nell'apparato mitotico [7, 8]. Le piccole dimensioni della survivina farebbero presupporre un

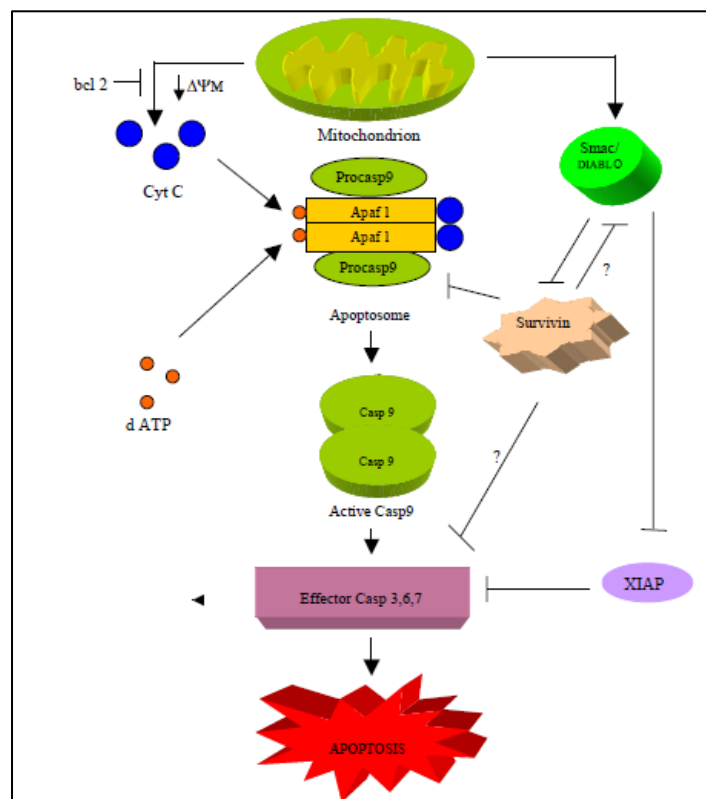
passaggio intracellulare compartimentale per semplice diffusione passiva, ed invece è stato dimostrato che il trasporto nucleo citoplasmatico della proteina avviene tramite un trasporto attivo identificato con un aumento del numero di proteine cellulari con varie funzioni biologiche, incluse proteine mitotiche e apoptotiche [6, 9].

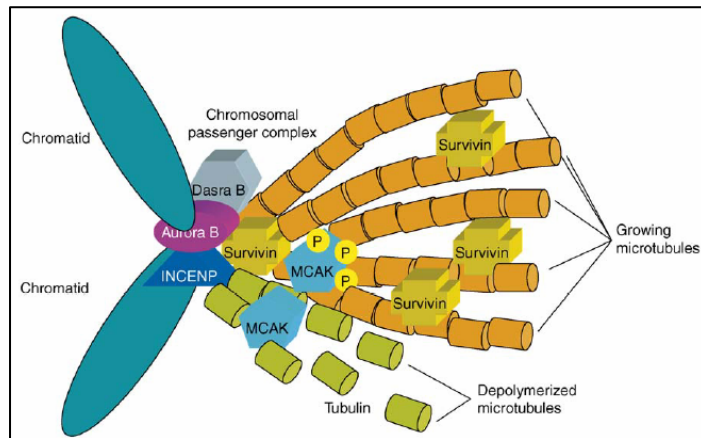
Ruolo della Survivina

La survivina gioca un ruolo chiave tra la regolazione dell'apoptosi ed il controllo della proliferazione cellulare. Come le altre IAPs ritrovate nelle cellule dei mammiferi, la survivina blocca l'apoptosi agendo come inibitore endogeno delle caspasi. L'inibizione dell'apoptosi consente la sopravvivenza di cellule che possiedono alterazioni genetiche, promuovendo di conseguenza l'acquisizione di ulteriori mutazioni e determinando la progressione neoplastica. Per la sopravvivenza le cellule dipendono dalla iperespressione di molecole anti-apoptotiche come Bcl-2, Bcl-xL o survivina. La regolazione negativa di queste proteine può ridurre la sopravvivenza cellulare. La survivina è espressa nella fase G2/M del ciclo cellulare, all'inizio della mitosi si associa con i microtubuli del fuso metafasico e anafasico ed è localizzata anche nei centrosomi associata alla γ -tubulina, alla caspasi 3 e all'inibitore p21 chinasi ciclina-dipendente formando un complesso molecolare. La localizzazione della survivina nell'apparato mitotico è legata alla sua funzione antiapoptotica; infatti è in grado di bloccare il segnale sia apoptotico proveniente da FAS che quello indotto dall'iperespressione di Bax, responsabile del rilascio del citocromo-c dal mitocondrio. Questo processo determina l'attivazione di un omologo di CED-4 (Cell Death), Apaf-1, che a sua volta dà inizio alla cascata delle proteasi apoptotiche con la processazione della caspasi 9 che terminano con l'attivazione della caspasi 3. La survivina inibisce quindi l'attivazione delle caspasi e l'apoptosi indotta da Fas/caspasi 8 e da Bax/citocromo-c. Ciò implica che la survivina agisca ad un punto di convergenza di queste vie apoptotiche, cioè, a livello degli effettori finali: le

caspasi 3 e -7. Pertanto l'attivazione della pro-caspasi 3 e pro-caspasi 7 è inibita nella cellula dalla survivina.

E' stato osservato che la mancata associazione tra la survivina ed i microtubuli causa una diminuzione della sua funzione antiapoptotica e un aumento dell'attività proteasica della caspasi 3, meccanismo richiesto nella morte cellulare durante la mitosi. La caspasi 3 è implicata nella proteolisi di proteine strutturali dell'apparato mitotico durante l'apoptosi mentre la survivina preserva l'integrità dell'apparato mitotico. La regolazione nell'espressione della survivina è sotto il controllo delle regioni CDE/CHR, ritrovate in alcuni geni espressi nella fase G2/M del ciclo cellulare. Tali regioni controllano la trascrizione periodica di survivina nella mitosi e potenzialmente agiscono come elementi repressori della fase G1. Quindi durante l'interfase la survivina è eliminata dalla via ubiquitina- e proteosoma-dipendente, che contribuisce ulteriormente alla sua presenza periodica nel ciclo cellulare [3, 10, 11].





Survivina e neoplasie

Una delle caratteristiche più significative della survivina è la sua differente espressione nelle neoplasie rispetto ai tessuti normali. La sua espressione, sia a livello trascrizionale che proteico, non si osserva in una varietà di tessuti normali, ad eccezione che, nelle cellule basali dell'epidermide, nelle cripte dell'epitelio del colon e nel timo a bassi livelli e in minore quantità nella placenta. La survivina è notevolmente espressa nelle più frequenti neoplasie. La sua espressione si riscontra nel 60% dei neuroblastomi, nel 78% dei carcinomi della vescica, nel 53% dei carcinomi del colon in tutti gli stadi e nel 35% dei carcinomi gastrici ed è altamente correlata con la prognosi. L'86% delle cellule del carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) esprimono survivina, e circa il 50% di piccoli adenocarcinomi con diametro minore di 2 cm. Nei pazienti con adenocarcinoma del polmone, la presenza della survivina nelle cellule tumorali rappresenta un marcatore di prognosi infausta e la scoperta della sua espressione sembra non solo essere un utile marcatore diagnostico, ma anche un nuovo target per la terapia antineoplastica per lo stadio precoce del NSCLC. La survivina può essere ricercata direttamente nei fluidi biologici dei pazienti neoplastici. Essa è stata trovata nell'urina di tutti i pazienti con carcinoma della vescica e in quelli che presentavano delle recidive. Attualmente, si stanno conducendo ulteriori studi per determinare se altri fluidi

biologici (es. saliva o siero) prelevati da pazienti con carcinoma siano positivi alla survivina. In trials retrospettivi, i pazienti con neoplasie che esprimevano survivina mostravano una sopravvivenza breve, associata con una positività di marcatori sfavorevoli della progressione della malattia neoplastica, aumento delle recidive, ed aumentata resistenza alla terapia.

Il carcinoma del colon-retto (CRC), seconda causa di morte per neoplasia nel sesso maschile e terza nel sesso femminile in Italia, è rappresentato nel 95% dei casi da forme sporadiche, mentre nel 5% origina da sindromi ereditarie quali la poliposi familiare del colon (FAP), la sindrome del carcinoma del colon-retto ereditario (HNPCC) e le sindromi dei polipi amartomatosi. L'apoptosi gioca un ruolo importante nel mantenere l'omeostasi in una popolazione di cellule che continuamente si rigenerano, come nell'epitelio del colon. Normalmente l'attività mitotica di cellule staminali epiteliali localizzate nella regione basale delle cripte del colon produce un continuo rifornimento di nuove cellule. La survivina è espressa alla base delle cripte normali, nella quale risiedono le cellule che proliferano, qui la proteina inibisce l'apoptosi conferendo alle cellule una sopravvivenza prolungata. Al contrario nella porzione intermedia delle cripte, l'espressione della survivina è diminuita. Infatti in questa regione le cellule del colon arrestano la proliferazione, vanno incontro a differenziazione e poi a maturazione. Nella parte più alta delle cripte, i livelli di APC (Adenomatous Polyposis Coli) sono elevati, mentre i livelli di survivina sono minimi o inesistenti. In questa regione le cellule vanno incontro alla differenziazione e poi all'apoptosi. L'inizio della tumorigenesi del colon potrebbe essere ricondotto a mutazioni del gene APC. Nelle cripte normali, l'inibizione dell'espressione della survivina regolata da APC nella regione intermedia delle cripte, genera una progenie di cellule staminali che deve essere eliminata attraverso l'apoptosi man mano che le cellule migrano nella parte alta delle cripte. Al contrario, nelle cripte che contengono APC mutato, la survivina viene espressa ed inibisce l'apoptosi. In questo caso le cellule staminali tendono a mantenere il loro fenotipo e a migrare

al di fuori dalla cripta. Infatti i pazienti con polipi adenomatosi familiari mostrano una proliferazione spostata verso la parte alta della cripta. Quindi l'incrementata espressione della survivina inibisce l'apoptosi, contribuisce all'immortalità cellulare, e può essere la chiave nel meccanismo iniziale della carcinogenesi del colon.

CELLULE STAMINALI

Lo studio sulle cellule staminali è oggi uno dei maggiori interessi scientifici e la loro utilizzazione nel campo delle nuove terapie sembra offrire interessanti prospettive.

Numerosi organi si rinnovano continuamente. Una continua rigenerazione permette di sostituire le cellule difettose o danneggiate. Come accade per i tessuti in sviluppo, le nuove cellule derivano da cellule chiamate "staminali".

Il termine cellula staminale è utilizzato per indicare una cellula indifferenziata che, una volta situata in un ambiente tissutale appropriato, è capace di moltiplicarsi (capacità di proliferazione) e di produrre cellule specializzate che acquisiscono la morfologia e la funzione specifiche del tessuto (capacità di differenziamento).

Caratteristica delle cellule staminali è di andare incontro ad una divisione asimmetrica e danno origine contemporaneamente ad una cellula staminale uguale alla cellula madre e ad una cellula progenitrice che, dopo un numero variabile di divisioni cellulari, produce uno o più tipi cellulari propri del tessuto a cui la staminale appartiene.

In relazione alla loro potenzialità, le cellule staminali si distinguono in:

- totipotenti, in grado di generare tutti i tessuti di un organismo;
- pluripotenti, possono specializzarsi in tutti i tipi di cellule che troviamo in un individuo adulto ma non in cellule che compongono i tessuti extra-embrionali;
- multipotenti che possono dare origine a diversi tipi cellulari, come ad es. le emopoietiche;
- unipotenti, da cui deriva un solo tipo cellulare.

Inoltre, in base alla provenienza se ne distinguono tre tipi:

- cellule staminali embrionali
- cellule staminali fetali
- cellule staminali dei tessuti adulti

Le cellule staminali embrionali si distinguono da quelle adulte per una proprietà essenziale: esse hanno infatti la capacità di generare tutti i tessuti dell'organismo, comprese le cellule della linea germinale. Le cellule staminali fetali si trovano negli stadi tardivi dell'embrione e nel feto e sono cellule multipotenti. Queste sono le cellule che in utero provvedono all'accrescimento dei tessuti, e che dopo la nascita diventeranno staminali adulte. Le cellule staminali adulte, invece, sono già impegnate in un loro programma tessutale specifico, il che spiega la loro eterogeneità, e, anche se alcune di loro possono portare alla formazione o alla rigenerazione dei tessuti differenziati (multipotenzialità), non sono tuttavia totipotenti

Le cellule staminali embrionali

Lo zigote rappresenta la prima cellula del nuovo individuo, è una cellula totipotente, ossia in grado di dar vita ad un intero organismo. Procedendo con le fasi di replicazione, tende a perdere questa sua peculiarità sino a specializzarsi nella produzione di un solo tipo di cellula. Allo stadio di blastocisti (dal quinto al settimo giorno dopo la fecondazione) dalla massa cellulare interna (20-30 cellule) incominciano a differenziarsi le cellule che formeranno l'embrione vero e proprio. Queste ultime cellule sono staminali "pluripotenti" (ES): hanno la potenzialità di differenziarsi in qualsiasi cellula di un animale adulto ma, a differenza delle cellule totipotenti, non sono in grado di dare origine ad un embrione.

Una volta che la blastocisti si è differenziata, le cellule ES ottenute hanno quindi perduto ogni possibilità di svilupparsi ulteriormente in un embrione, ma possono essere messe in coltura in laboratorio e propagate all'infinito, conservando il loro carattere di "pluripotenzialità" e

conservando intatto il genoma. Poste in idonee condizioni di coltura, queste cellule mantengono la capacità di differenziare in cellule specializzate corrispondenti a tutti i tessuti dell'organismo (cuore, sangue, neuroni, tessuto muscolare).

In relazione alla loro capacità di riprodursi indefinitamente e di dare origine a tutti i tipi di cellule esistenti, le cellule staminali embrionali rappresentano un fondamentale e prezioso strumento di ricerca. Grazie ad esse i ricercatori possono studiare lo sviluppo dell'embrione, comprendere meccanismi collegati alla proliferazione cellulare, utili soprattutto nelle indagini sperimentali effettuate sulle cellule tumorali, e valutarne le potenzialità terapeutiche [12]

Le cellule staminali fetali

Le cellule staminali fetali sono generate da tessuti fetali in uno stadio molto più avanzato (5-9 settimane) rispetto a quello di blastocisti e sono isolate dal feto, esito di aborto terapeutico.

Se ne distinguono due classi:

- Cellule somatiche fetali

Come i tessuti adulti, anche i tessuti fetali contengono cellule staminali. Tra questi, le cellule staminali della zona periventricolare del sistema nervoso centrale rappresentano un'opportunità terapeutica per il trattamento di alcune patologie neurovegetative (Morbo di Parkinson, Corea di Huntington).

- Cellule germinali (EG)

Sono generate dall'abbozzo di tessuto germinale del feto. Sono pluripotenti come le cellule ES ed hanno la stessa capacità di proliferazione; il loro genoma tuttavia è meno stabile di quello delle ES il che le rende, per ora, inutilizzabili in una prospettiva terapeutica, pur aprendo importanti prospettive nella ricerca di base [12].

Le cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte assicurano il mantenimento fisiologico di un organo o di un tessuto sostituendo le cellule morte, sia naturalmente sia in seguito ad una lesione, assicurando così la continuità della funzione dell'organo durante la vita dell'individuo. Esse adempiono a tale funzione, grazie alla capacità di effettuare una divisione asimmetrica, tramite la quale si moltiplicano in modo identico (onde evitare l'esaurimento della riserva di cellule staminali) e si differenziano, acquisendo così le caratteristiche del tessuto da riparare.

Numerosi lavori hanno portato all'identificazione e caratterizzazione di cellule staminali in tessuti come quello nervoso [13], ematopoietico [14], epidermico [15], intestinale [16], osseo [17], pancreatico [18], epatobiliare [18], muscolare liscio e scheletrico [19].

Le cellule staminali di intestino, sangue e pelle si dividono in continuazione durante la vita, per rinnovare regolarmente le cellule di questi tre tessuti. Le cellule staminali degli altri tessuti si attivano quando c'è la necessità di una riparazione.

Le cellule staminali adulte non sono considerate pluripotenti essendo generalmente "programmate" per un determinato tessuto; non si moltiplicano all'infinito allo stato indifferenziato e sono molto eterogenee, tenuto conto della diversità dei tessuti dell'organismo ai quali esse appartengono.

Alcune sono "multipotenti": possono produrre infatti cellule molto differenti per morfologia e per funzione e sono, di norma, raggruppate all'interno di uno stesso organo o tessuto. E' il caso delle cellule staminali ematopoietiche che producono tutte le cellule del sangue (globuli rossi, globuli bianchi, linfociti e alcune strutture vascolari) e delle cellule staminali neurali che producono neuroni ed anche le cellule accessorie del sistema nervoso (astrociti, oligodendrociti).

Altre sono, al contrario, "unipotenti" e producono un solo tipo cellulare come le cellule dell'epidermide da cui originano solo cheratinociti.

Altre infine hanno un potenziale intermedio: è il caso delle cellule staminali mesenchimali, localizzate nel midollo osseo, che producono cellule ossee, cartilaginee e probabilmente muscolari.

I progenitori cellulari

I progenitori cellulari hanno origine dalla divisione delle cellule staminali, ma hanno già acquisito durante il loro sviluppo un certo grado di specializzazione e sono quindi fisiologicamente funzionali. Nonostante abbiano perduto le caratteristiche delle cellule staminali propriamente dette, si dividono infatti per un periodo di tempo limitato e meno efficacemente, possono essere ottenute in gran quantità a partire dalle cellule staminali. In futuro potranno essere utilizzati in ambito terapeutico per riparare un deficit transitorio di un organo o di un tessuto. A questa categoria appartengono le cellule muscolari "satellite", gli epatociti fetali, i precursori ematopoietici, le cellule delle isole pancreatiche e certi neuroni.

CHEMIOTERAPIA

La chemioterapia ha rappresentato per molti anni la principale strategia terapeutica farmacologica nelle neoplasie, è una terapia adiuvante alla chirurgia sia dopo l'asportazione della massa tumorale che a volte prima dell'operazione allo scopo di ridurre le dimensioni tumorali. Il suo limite è stato subito evidente di fronte alle piccole dimensioni del tumore, alla sua inaccessibilità, alla estensione dell'invasione, alla presenza delle metastasi e soprattutto al coinvolgimento di strutture importanti dell'organismo come vasi e nervi. Con la scoperta delle radiazioni ed i progressi della farmacologia, sono nate la radioterapia e la chemioterapia, quest'ultima tesa ad interferire con l'attività proliferativa cellulare. La conoscenza delle fasi specifiche del ciclo cellulare e della chimica del DNA ha permesso l'individuazione e lo sviluppo di numerosi agenti chimici con azione antiproliferativa e antitumorale, che hanno

posto la base per la chemioterapia antiproliferativa dei tumori. Gli agenti chemioterapici presentano una parziale selettività derivante dal presupposto che è possibile colpire la cellula tumorale durante una specifica fase del ciclo. Tuttavia questo presupposto razionale non mette al riparo le cellule normali ad alto turn-over in proliferazione, i compartimenti proliferanti del midollo osseo e degli epitelii. Pertanto gli effetti tossici di questi trattamenti sono molto alti in confronto ai benefici terapeutici che ne possono derivare. Tra gli agenti chimici ad azione antiproliferativa ed antiblastica, si distinguono i chemioterapici che interagiscono direttamente con il DNA (agenti alchilanti e antibiotici antitumorali) e quelli che agiscono indirettamente con il DNA (antimetaboliti e anticitoscheletrici). Tra le molecole che interagiscono direttamente con il DNA ve ne sono alcune che formano addotti e doppi legami tra le due catene, impedendo la replicazione. Ad esempio il cisplatino e l'oxaliplatino, comunemente utilizzati in clinica per il trattamento del carcinoma del colon, impediscono la replicazione del DNA in quanto sono agenti alchilanti che vengono trasformati in ioni carichi positivamente in grado di formare legami covalenti con gli acidi nucleici.

Tra le molecole che agiscono indirettamente con il DNA vi sono soprattutto gli antimetaboliti che agiscono con vari meccanismi di azione interferenti con la sintesi e la replicazione del DNA. Causando danni irreversibili al DNA, l'azione finale dei chemioterapici si esplica nell'attivazione della via intrinseca o mitocondriale del processo di morte programmata nelle cellule tumorali. I recettori di morte e i chemioterapici esplicano la loro azione attivando i due principali pathways apoptotici, rispettivamente il pathway estrinseco e il pathway intrinseco o mitocondriale. In particolare il legame di CD95, TRAIL-R1 e TRAIL-R2 ai rispettivi ligandi induce il raggruppamento dei recettori e la formazione del DISC. Tale complesso recluta e attiva la caspasi 8 e 10 attraverso la molecola adattatrice FADD. L'attivazione della caspasi 8 può essere inibita da proteine omologhe quali c-FLIP e PED/PEA15. I chemioterapici sono invece una classe di composti citotossici che attivano principalmente il pathway intrinseco,

causando il rilascio dal mitocondrio di vari fattori di morte come il citocromo-c, APAF-1, AIF e Smac/DIABLO. Entrambi i pathways convergono nell'attivazione delle caspasi. Sebbene spesso le cellule tumorali esprimano i recettori di morte TRAIL e CD95L, l'aggregazione indotta dai ligandi è insufficiente ad indurre apoptosi. Tuttavia, le cellule tumorali hanno la capacità di sviluppare una resistenza alla chemioterapia, spesso pleiotropica. La chemioresistenza è una delle principali problematiche dell'oncologia clinica, in quanto non riuscendo ad inibire la crescita della massa tumorale si restringono le prospettive di vita del paziente. La capacità delle cellule tumorali di resistere all'effetto citotossico del chemioterapico dipende da alterazioni nei meccanismi di controllo del ciclo cellulare e del macchinario antiapoptotico.

La resistenza all'apoptosi indotta dai recettori di morte potrebbe contribuire allo sviluppo e alla progressione tumorale. Inoltre, le cellule epiteliali tumorali resistenti all'apoptosi indotta dai recettori di morte sono resistenti anche all'apoptosi indotta dai chemioterapici e dalle radiazioni. Molti studi indicano la presenza, nel microambiente tumorale, di diverse citochine rilasciate sia dai linfociti T infiltranti che dalle cellule tumorali.

CITOCINE

Le citochine sono proteine prodotte dalle cellule di entrambi i compartimenti del sistema immunitario, quello innato e quello specifico, in grado di mediare molte delle funzioni svolte da tali cellule. Le citochine sono secrete in risposta agli antigeni e stimolano risposte diversificate da parte delle cellule coinvolte nei processi immunitari ed infiammatori. Nella fase di attivazione delle risposte immunitarie esse favoriscono la crescita e la differenziazione dei linfociti, mentre nella fase effettrice attivano cellule diverse promuovendo l'eliminazione degli antigeni. Alcune citochine fungono anche da stimolatori dello sviluppo delle cellule ematopoietiche. Nella pratica medica le citochine rappresentano ormai un importante

strumento terapeutico, e possono costituire un possibile bersaglio da antagonizzare al fine di curare molte malattie immunitarie ed immunoinfiammatorie. Sebbene strutturalmente molto diverse, le citochine hanno in comune alcune caratteristiche.

La secrezione di citochine è un evento di breve durata ed auto limitato, di solito, non sono immagazzinate nelle cellule, ma la loro sintesi richiede la trascrizione di geni fino ad allora silenti, attivati a seguito della stimolazione della cellula. Questa attivazione trascrizionale è transitoria, e gli RNA messaggeri che codificano la maggior parte delle citochine sono instabili, la sintesi è di breve durata. La produzione di alcune citochine può essere controllata anche da meccanismi di processazione alternativa dell'RNA e da meccanismi post-trascrizionali, quali la liberazione per proteolisi di una molecola attiva a partire da un precursore inattivo.

L'interleuchina-4

L'interleuchina-4 appartiene alla famiglia di citochine a 4 domini a α eliche. La sua principale sorgente cellulare sono i linfociti T CD4⁺ appartenenti alla sottopopolazione Th2; IL-4 può essere prodotta anche da mastociti e basofili. Il recettore per l'IL-4 espresso dalle cellule linfoidi è formato da una catena α deputata al legame della citochina, appartenente alla famiglia per citochine di tipo I, associata alla catena γ presente nel recettore per l'IL-2. Il segnale trasmesso da questo recettore innesca sia una via JAK/STAT che una via chiamata IRS-2 (Insulin Response Substrate), che coinvolge il substrato di risposta all'insulina. Nelle cellule non linfoidi la catena α del recettore per l'IL-4 non è associata con la catena γ , ma con una catena deputata alla trasduzione del segnale che fa parte anche del recettore dell'IL-13. L'IL-4 è la principale citochina responsabile dello scambio isotipico verso la classe IgE nei linfociti B e dello sviluppo di cellule Th2 dai linfociti T helper CD4⁺ vergini, comportandosi per tale popolazione come fattore di crescita autocrino. Nelle cellule ematopoietiche, l'IL-4 si

lega al complesso recettoriale di tipo I, il complesso tra IL-4R α e γ C, mentre nelle cellule non ematopoietiche come le epiteliali, muscolari, fibroblasti e splenociti si lega ai recettori di tipo II, quali IL-4R α e IL-13R α 1, con differente affinità. Esiste anche un terzo tipo di recettore IL-13R Decoy, IL-13R α 2 che agisce fundamentalmente come un forte inibitore del segnale dell'IL-13 e dell'IL-4. Infine, recentemente è stato messo in evidenza il rapporto tra l'IL-4 e lo sviluppo dei tumori. In particolare, diversi studi indicano che l'IL-4 è prodotta dalle cellule tumorali epiteliali ed agisce da fattore autocrino di sopravvivenza mediante la regolazione di proteine coinvolte nel processo apoptotico. L'IL-4 aumenta i livelli di espressione di numerose proteine anti-apoptiche mentre la sua privazione causa la sensibilizzazione delle cellule tumorali alla chemioterapia riducendo i livelli di espressione delle stesse proteine [20-22].

OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo dello studio è stato quello di verificare l'espressione della survivina nelle cellule primarie e nelle cellule staminali tumorali di colon, e di studiare una possibile correlazione tra la survivina e l'interleuchina-4. A tal fine è stato necessario il reclutamento di pezzi operatori provenienti dalla chirurgia d'urgenza diretta dal Prof. Gulotta. I pezzi operatori, sia tumorali che le mucose normali adiacenti ai tumori, sono stati sottoposti ad un protocollo specifico che conduce all'isolamento in coltura di cellule di colon sia primarie che staminali tumorali. La caratterizzazione delle cellule staminali tumorali di colon è stata effettuata dai laboratori di ricerca diretti dal Prof. De Maria e dal Prof. Stassi, il marcatore di superficie identificato è rappresentato dalla proteina glicosilata CD133. I campioni presi in esami sono stati caratterizzati dalla presenza di antigeni specifici che ne dimostrano il tessuto di provenienza e il grado di differenziazione ed è stata anche verificata la marcatura verso CD133. Recenti lavori hanno dimostrato che le cellule primarie e le staminali tumorali di colon producono autocrinamente l'interleuchina-4, una citochina responsabile della resistenza apoptotica nelle cellule tumorali. Mediante indagini di immunofluorescenza si è voluto verificare la presenza di IL-4 e del recettore specifico IL-4R α nei campioni presi in esame. L'obiettivo dello studio a questo punto è stato quello di verificare l'espressione della survivina e della sua forma attiva, nelle cellule primarie, staminali tumorali e differenziate dalle sfere di colon. È noto che il pathway dell'IL-4 attiva due vie di trasduzione del segnale, la via Akt/PI3K e la via JAK1/STAT6, e che la stimolazione da parte dell'interleuchina-6 porta all'aumento dell'espressione della survivina, tramite la fosforilazione di STAT-3 e la sua successiva traslocazione nel nucleo; l'obiettivo successivo, quindi, è stato quello di dimostrare se esiste la stessa correlazione tra IL-4 e la survivina tramite la via che vede il reclutamento di STAT6, nei campioni tumorali di colon. Esaminata l'attivazione del pathway, si è proceduto con il dimostrare se tale connessione avviene direttamente tramite l'attivazione di STAT6. Per tale

scopo è stato usato un farmaco, la leflunomide, capace di inibire la fosforilazione di STAT6. La risposta al trattamento ha portato il lavoro all'analisi della localizzazione intracellulare della survivina. Il lavoro del Prof. Stassi e collaboratori, ha dimostrato che la somministrazione di un numero esiguo di cellule staminali tumorali CD133+ di colon nel sottocute di topo, genera un tumore con le stesse caratteristiche del tumore originario e che la neutralizzazione dell'IL-4 sensibilizza le cellule tumorali al trattamento chemioterapico, l'oxaliplatino, riducendo *in vitro* i livelli d'espressione di molecole anti-apoptotiche ed *in vivo* le dimensioni del tumore. L'ultimo punto è stato quello di verificare negli xenograft, sia l'espressione che la localizzazione della survivina per spiegare la possibile correlazione tra il meccanismo d'azione dell'IL-4 e le diverse funzioni svolte dalla survivina quando si trova dislocata nei diversi compartimenti intracellulari, citoplasmatici o nucleari.

MATERIALI E METODI

PURIFICAZIONE E COLTURA DI CELLULE STAMINALI E DIFFERENZIATE TUMORALI DA TESSUTI EPITELIALI DI COLON

I campioni di carcinoma del colon sono mantenuti in ghiaccio in penicillina e streptomina. Dopo 24 ore i campioni subiscono digestione enzimatica con collagenasi e ialuronidasi. Il digesto ottenuto è usato in parte per ottenere cellule tumorali primarie differenziate e in parte per la purificazione di cellule staminali tumorali. Le cellule primarie e le differenziate dalle sfere vengono poste in un terreno di coltura in presenza di siero mentre le cellule staminali tumorali vengono mantenute in un mezzo di coltura privo di siero e contenente fattori di crescita. In queste condizioni le cellule tumorali più differenziate e le cellule normali connesse al tumore muoiono, mentre le cellule staminali neoplastiche si espandono indefinitamente formando aggregati cellulari contenenti sia cellule staminali che progenitori neoplastici (sfere). Dopo una settimana, sono ottenuti aggregati sferici fluttuanti, che sono capaci di aumentare in numero. Il passaggio di queste colture è effettuato disgregando gentilmente ogni 7 giorni le sfere in crescita. La conta vitale delle cellule normali e neoplastiche viene effettuata usando il trypan blue, un colorante che discrimina le cellule non vitali colorandone il citoplasma.

IMMUNOENZIMATICA

I campioni di tumore al colon primario e derivato da trapianto delle cellule staminali tumorali di colon nel topo, sono stati inclusi in paraffina. Le sezioni spesse 5 μm sono state paraffinate in xilolo e reidratate mediante una scala discendente di etanolo (100%-50%) fino ad un breve passaggio in acqua distillata. Dopo un'incubazione di 5' in PBS 1X, le sezioni sono state trattate con retrieval e permeabilizzate per 10' con PBS/TritonX 100. Dopo un lavaggio, la

perossidasi endogena viene inibita con H_2O_2 (3min) e successivamente incubate per 10' con la blocking solution (BSA 3% in PBS 1X) per bloccare i siti antigenici aspecifici. Le sezioni sono state incubate a 4°C tutta la notte con anticorpi specifici. Dopo un lavaggio, i campioni sono stati incubati per 30' a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario biotinilato e 30' con streptavidina coniugata con l'enzima perossidasi. La colorazione è stata visualizzata usando come substrato colorimetrico della perossidasi il 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC), che reagendo con l'enzima sviluppa un precipitato di colore rosso. I nuclei sono stati contrastati con ematossilina e virati con Ammonia Water.

IMMUNOFLUORESCENZA

I campioni sono incubati per 5' in PBS, 3'.in PBS/TRITON X-100 e incubati per 1h a 37°C con l'anticorpo primario, lavati in PBS e incubati per 1h a 37°C con l'anticorpo secondario coniugato al fluorocromo (Rhodamina). Contrasto con Hoescht.

ISOLAMENTO DELLE PROTEINE E WESTERN BLOTTING

Le cellule staccate dalle fiasche di coltura con tripsina/EDTA e le sfere fluttuanti sono state centrifugate e i pellet cellulari lavati in PBS e risospesi in lysis buffer NP40 freddo (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% NP-40), contenente gli inibitori delle proteasi PMSF (1mM), leupeptina (1µg/ml), pepstatina (1µg/ml), e aprotinina (1µg/ml) ed inibitori delle fosfatasi NaF (0,5M) e Na_3VO_4 (1mM). Le cellule sono state mantenute in ghiaccio per 30' e successivamente centrifugate a 13000 rpm per 10' a 4°C. La concentrazione proteica dei lisati è stata determinata mediante metodo Bradford. Le concentrazioni sono state valutate allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda pari a 595 nm. Aliquote degli estratti cellulari pari a 30µg di proteine sono state addizionate con i sample buffer, bolliti per 3' e caricati su un gel di poliacrilamide. Gli estratti proteici sono stati

separati mediante elettroforesi e trasferiti su filtri di nitrocellulosa. Dopo aver opportunamente lavato i filtri in TBS-T (TBS contenente 0.05% Tween 20) sono stati incubati un'ora con la blocking solution (latte 5% in TBS-T) per bloccare i siti di riconoscimento aspecifici e poi un'ora a temperatura ambiente (oppure tutta la notte a 4°C) con gli anticorpi specifici alle opportune diluizioni in TBST-BSA 1%. Dopo aver lavato i filtri per eliminare l'eccesso di Ab primario, questi sono stati incubati un'ora con anticorpo secondario specifico (anti-mouse o anti-rabbit) coniugato con l'enzima perossidasi e poi trattati con un substrato per lo sviluppo della reazione chemiluminescente.

VITALITA' CELLULARE

La vitalità cellulare è stata calcolata mediante il saggio colorimetrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromide) che si basa sulla riduzione intracellulare dei sali di tetrazolio da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi (SDH) in cristalli di un prodotto bluastro denominato formazano. La reazione avviene solo nelle cellule metabolicamente attive e il valore della densità ottica (O.D.), ottenuta mediante lettura spettrofotometrica, è correlata al quantitativo di cellule vitali presenti. Le cellule sono state seminate in triplicato in piastre da 96 pozzetti e dopo 24h è stata aggiunta la leflunomide a concentrazione crescente da 0 a 200µM per 48h. La soluzione di MTT è stata aggiunta alle cellule e incubata per 4 ore a 37°C al buio in incubatore. La vitalità cellulare è stata determinata mediante misurazione dell'O.D. a 550 nm utilizzando il lettore ELISA Microplate Reader. Mediante la colorazione dell'arancio di acridina, un colorante-intercalante specifico per la distinzione cromatica di DNA e RNA, abbiamo osservato la vitalità cellulare. Il colorante è capace di intercalarsi nell'acido nucleico ed emettere una fluorescenza di lunghezza d'onda pari a 525 nm, cioè di colore giallo-verde o di 650 nm, cioè luce rossa identificando rispettivamente le cellule vive da quelle morte. Un volume pari a 5 µl di

sospensione cellulare è stato posto su vetrino copri oggetto, ed è stato aggiunto un uguale volume di una soluzione di arancio di acridina preparata in ETOH 95° e PBS. Le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza e fotografate.

Real Time PCR

L'RNA totale è stato isolato dai campioni mediante l'RNasy Mini Kit (Qiagen). 2 µg di RNA totale di ogni campione è stato retrotrascritto mediante Archieve kit (Applied Biosystem). Le condizioni di reazione sono: 95°C per 10 min e 50 cicli a 95°C per 15 s e 60°C per 1 min. La quantizzazione relativa dell'espressione del gene della survivina è calcolata usando il metodo comparativo Ct (Ct). Le quantificazioni sono normalizzate dal controllo endogeno Hu GAPDH. L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante l'ABI PRISM SDS, software version 2.1 (Applied Biosystems). Le cellule Hela sono usate come controllo positivo della survivina.

XENOGRAFT

I topi nudi sono acquistati dalla Charles River Laboratories (Milan, Italy) e gli esperimenti sono condotti seguendo le normative vigenti, osservando tutti i principi interdisciplinari e le linee guide per l'uso di animali nella ricerca. I topi hanno ricevuto una iniezione sottocutanea di cellule staminali tumorali di colon in 200 µl di PBS. Dopo 10 giorni, quando i tumori sono nell'ordine di grandezza di circa 0.25 cm³, sono stati trattati intraperitonealmente con l'oxaliplatino da solo (0.40 mg/kg una volta a settimana ogni 4 settimane) o in combinazione con il neutralizzante Abs contro IL-4 (R&D Systems; 10 mg/cm³ due volte a settimana per 3 settimane). I controlli sono eseguiti iniettando PBS. I tumori sono misurati settimanalmente con un calibro e la massa tumorale è calcolata dalla formula: $(\pi/6) \times \text{diametro maggiore} \times (\text{diametro minore})^2$.

ANALISI STATISTICA

Tutti gli esperimenti sia *in vivo* che *in vitro* sono stati ripetuti almeno tre volte. I dati sperimentali sono stati analizzati ed espressi come media e deviazione standard della media.

RISULTATI

Raccolta e caratterizzazione dei campioni

Dal 2006 al 2008 sono stati raccolti 20 campioni di tumore al colon e le rispettive mucose circostanti sane, da 9 pezzi tumorali è stato possibile isolare e propagare cellule staminali tumorali in coltura. Il tessuto tumorale preso in esame è stato valutato dalla colorazione ematossilina e eosina e da reazioni di immunistochemica che hanno mostrato una positività verso la citocheratina-20, un'antigene citoplasmatico tipico delle cellule differenziate di colon e una negatività verso la citocheratina 7, tipica di tessuti epiteliali sani (Fig.1A). Mediante l'indagine in immunofluorescenza, le cellule staminali tumorali sono risultate negative verso la CK-20 e positive per il marcatore specifico di staminalità di colon quale CD133. Al contrario le cellule primarie e le cellule differenziate dalle sfere, hanno mostrato un' aspettata positività verso la CK-20 e negatività verso CD133 (Fig.1B).

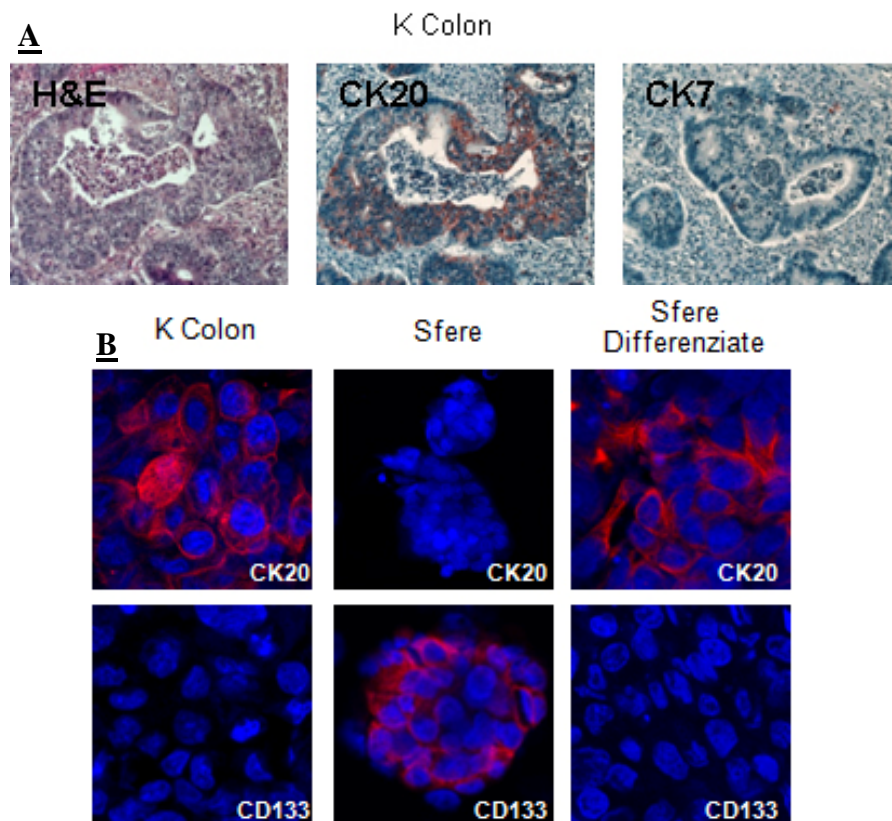


Fig.1 **A** H&E ed espressione di CK20 e CK7 nel K Colon; **B** Espressione di CK20 e CD133 nel K Colon, nelle sfere tumorali di colon e nelle cellule differenziate da esse.

Espressione dell'IL-4 e del recettore IL-4R α

Le cellule staminali tumorali di colon e le differenziate ottenute dalle stesse poste in condizioni di aderenza producono l'interleuchina 4 e esprimono sulla loro superficie cellulare il recettore IL-4R α come mostrato dalle immagini di immunofluorescenza (Fig.2).

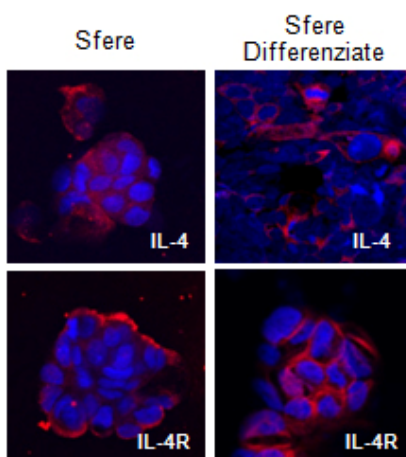


Fig.2 Espressione di IL-4 e IL-4R nelle sfere tumorali di colon e nelle cellule differenziate da esse.

Espressione della survivina e della forma fosforilata

Mediante real time PCR, è stato possibile quantificare il trascritto della survivina in valore relativo rispetto all'mRNA della GAPDH. In particolar modo, abbiamo trovato che il messaggero della survivina è risultato ugualmente espresso ad elevati livelli sia nelle cellule primarie della mucosa sana che primarie tumorali e nelle cellule staminali dopo induzione del differenziamento. I livelli di mRNA si abbassano, seppur rimanendo presente, nelle cellule staminali tumorali di colon. La linea cellulare HeLa è stata utilizzata come controllo positivo (Fig.3A). In accordo ai livelli di messaggero, mediante western blot, abbiamo trovato che la survivina è risultata abbondantemente espressa nelle cellule primarie tumorali di colon e nelle cellule differenziate da staminali, minori livelli di espressione nelle cellule staminali tumorali di colon. Mentre è risultata assente nella cellule della mucosa sana di colon (Fig.3B).

Mediante western blot si è visto che la forma fosforilata della survivina è espressa nelle cellule primarie tumorali di colon e nelle sfere poste in differenziamento, inoltre è espressa seppur debolmente nelle cellule staminali tumorali di colon, mentre risulta assente nelle cellule della mucosa sana di colon (Fig.3B).

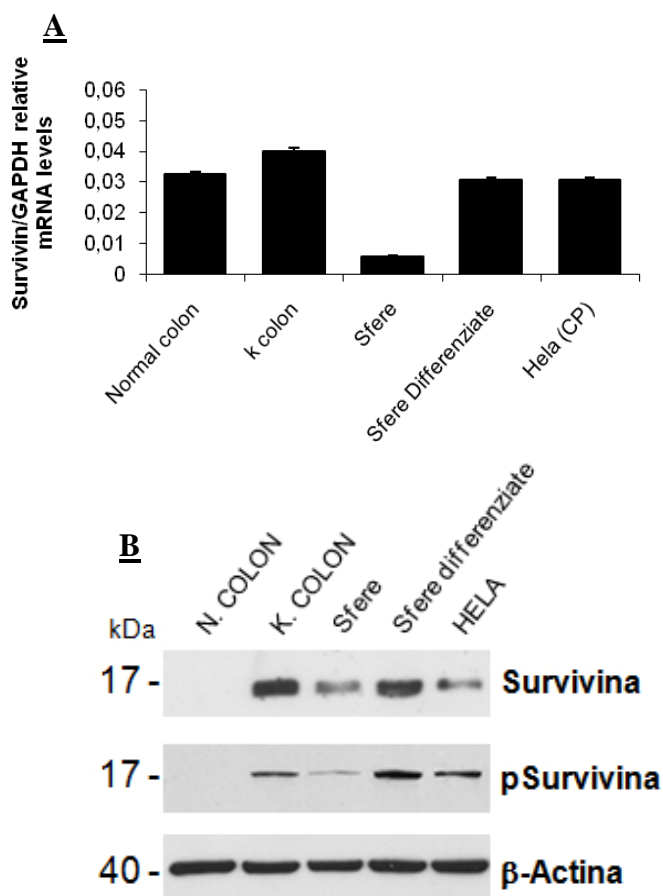


Fig.3 **A** Real time PCR della survivina nei campioni di colon; **B** Espressione della survivina e della forma fosforilata nei campioni di colon.

Correlazione tra IL-4, STAT-6 e survivina.

Il pathway dell'IL-4 attiva a valle la proteina STAT-6, la quale viene successivamente fosforilata da tirosine-chinasi per poi traslocare nel nucleo. Mediante trattamenti *in vitro*, si è voluto dimostrare se nei campioni analizzati questa via risulta attiva. Non solo le cellule staminali ma anche le cellule differenziate da sfere, entrambe trattate con IL-4 per 48 h, hanno

mostrato un aumento dei livelli della survivina e di STAT-6, così come delle rispettive forme fosforilate. I livelli delle stesse proteine si riducono dopo esposizione al neutralizzante, α -IL-4 per 48h in entrambi i campioni presi in esame (Fig.4).

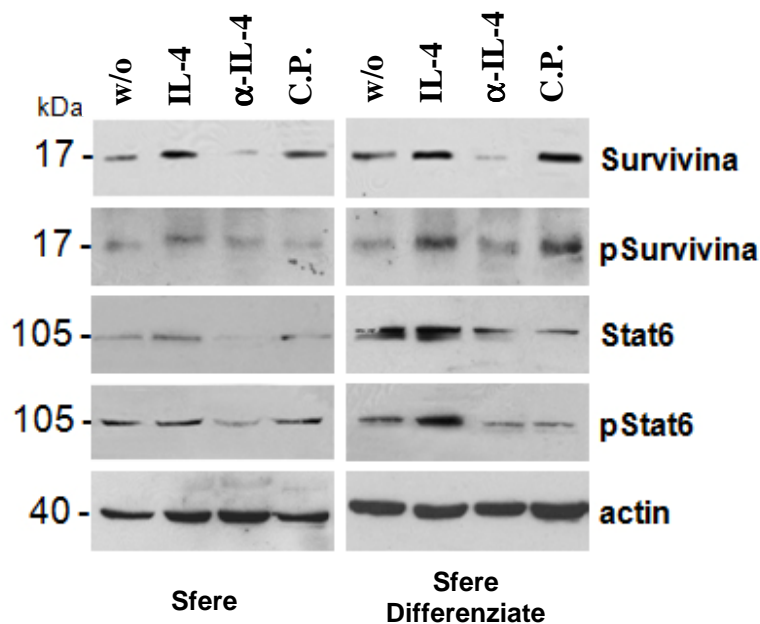


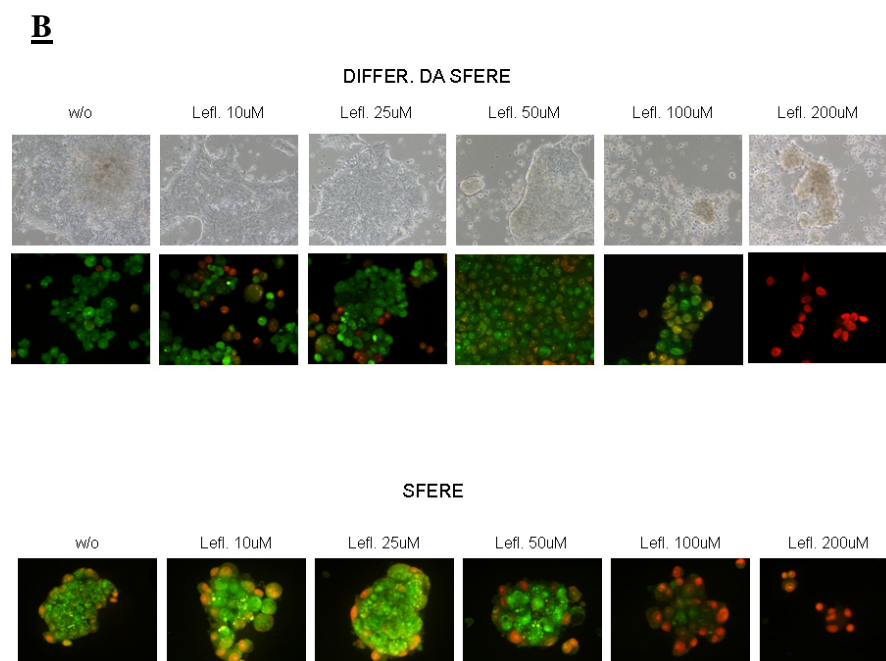
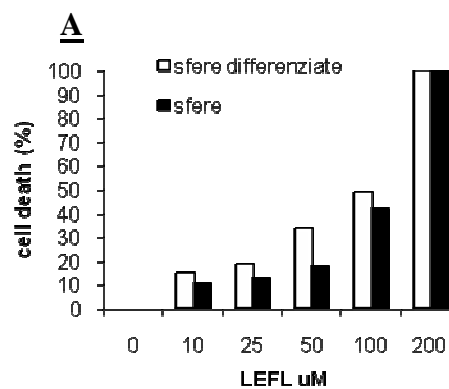
Fig.4 Espressione della survivina, survivina fosforilata, STAT6 e STAT6 fosforilata nelle sfere tumorali di colon e nelle cellule differenziate da esse.

Trattamento con la leflunomide

Al fine di indagare se esiste una diretta correlazione tra STAT-6 e la survivina, mediante l'attivazione del promotore della survivina, abbiamo bloccato la fosforilazione di STAT-6 per arrestarne il suo traslocamento nel nucleo. L'inibizione di STAT-6 fosforilata è stata effettuata dalla leflunomide, un farmaco immunosoppressore selettivo che agisce nei linfociti attivati come inibitore della sintesi pirimidinica bloccando quindi la divisione cellulare. Recentemente è stato dimostrato che questo farmaco inibisce le tirosine chinasi interferendo con la trasduzione del segnale attivata attraverso la fosforilazione di STAT-6 [23]. Inizialmente è stato indispensabile condurre una curva dose-risposta del farmaco con concentrazioni crescenti da 0-200 μ M della leflunomide sia nelle cellule staminali tumorali

che nelle differenziate di colon, al fine di scegliere il valore di Ic_{50} da usare nei successivi esperimenti. La mortalità cellulare è stata calcolata mediante saggio “MTT” e abbiamo scelto come valore Ic_{50} , quello di $100 \mu M$ (Fig.5A). Come conferma, mediante la colorazione arancio-acridina, è stata possibile seguire la mortalità delle cellule trattate *in vitro* con il farmaco a concentrazioni crescenti; le cellule colorate in rosso sono le cellule morte mentre quelle verdi sono ancora vive (Fig.5B).

Mentre mediante western blot, abbiamo voluto verificare l’inibizione della fosforilazione di STAT-6. L’analisi proteica dei livelli di STAT-6 fosforilata ha mostrato una riduzione dell’espressione proporzionale all’aumento della concentrazione del farmaco in entrambe le cellule prese in esame (Fig.5C).



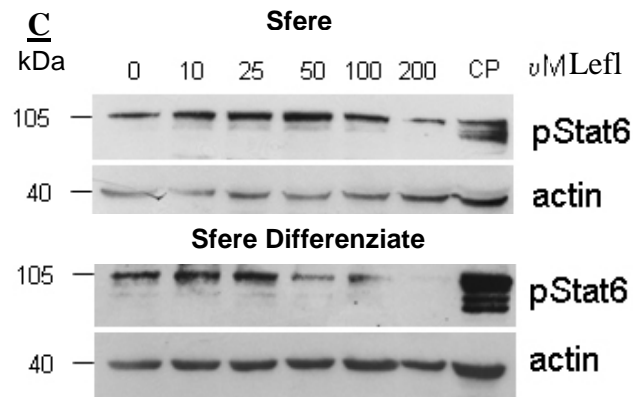


Fig.5 **A** Dose risposta della leflunomide; **B** Colorazione arancio-acridina nelle sfere tumorali di colon e nelle cellule differenziate da esse; **C** Espressione di STAT6 fosforilata nelle cellule staminali tumorali di colon e nelle cellule differenziate da esse.

Analisi della survivina dopo trattamento con la leflunomide

Una volta verificata l'efficacia della leflunomide sui livelli di pSTAT-6, abbiamo analizzato i livelli di espressione sia della survivina wild-type che della sua forma fosforilata nelle cellule trattate, al fine di studiare se esiste una reale connessione diretta tra pSTAT-6 e l'espressione della survivina. Mediante l'analisi di immunofluorescenza si è visto che il trattamento con la leflunomide non ha regolato i livelli della survivina o della sua forma fosforilata, rimaste entrambe espresse ad elevati livelli, ma bensì ha evidenziato una possibile regolazione nella localizzazione della proteina e della sua forma attiva. Le cellule staminali e le cellule differenziate tumorali di colon presentano un'espressione della survivina e della sua forma fosforilata prevalentemente citoplasmatica, in seguito al trattamento con la leflunomide l'espressione di entrambe le proteine, fosforilata e non, risulta prevalentemente a livello nucleare. Seppure una piccola percentuale di cellule in assenza del trattamento mostrano un'espressione della survivina localizzata nel nucleo, ciò può essere spiegato dalla presenza di cellule in fase di divisione (Fig.6).

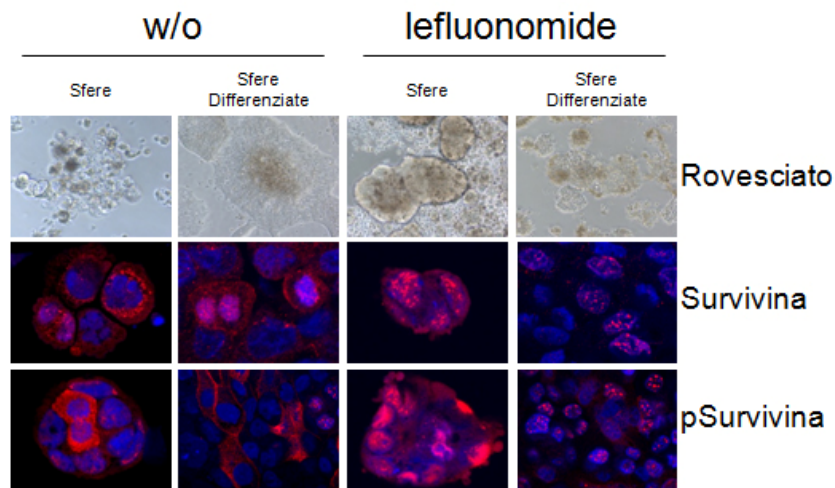


Fig.6 Espressione della survivina e della survivina fosforilata nelle sfere e nelle cellule differenziate da esse senza trattamento o dopo trattamento con la leflunomide.

Analisi della survivina nei trattamenti *in vitro*

Abbiamo voluto vedere se i co-trattamenti con il neutralizzante dell'IL-4 e l'oxaliplatino potessero portare ad una differente localizzazione intracellulare della survivina. In particolar modo mediante immunofluorescenza, si è visto che l'espressione della survivina permane nel citoplasma sia nelle cellule trattate con l'oxaliplatino che in quelle trattate con l'IL-4, mentre risulta nella sua totalità a livello nucleare dopo i singoli trattamenti con la leflunomide o l' α -IL-4, e nei co-trattamenti con leflunomide e α -IL-4 o oxaliplatino e α -IL-4. Inoltre nel co-trattamento con l'oxaliplatino e la leflunomide, l'espressione della survivina risulta in entrambi i compartimenti cellulari (Fig.7).

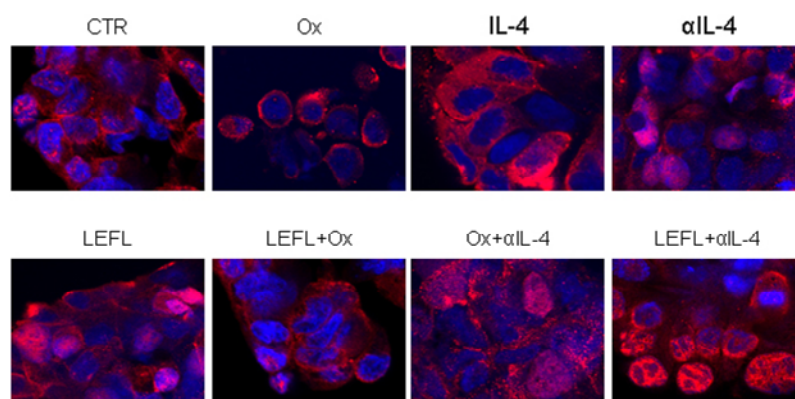


Fig.7 Espressione della survivina nelle cellule staminali differenziate tumorali di colon trattate.

Espressione della survivina negli xenograft trattati *in vivo*

Una volta visto l'esperimento *in vitro* siamo passati a verificare l'espressione e la localizzazione della survivina negli xenograft trattati.

Un numero esiguo di cellule staminali tumorali di colon CD133⁺ iniettate *in vivo* nel sottocute di topo, sono risultate capaci di generare un tumore con le stesse caratteristiche del tumore originario. E' noto che la neutralizzazione dell'IL-4 sia *in vitro* che *in vivo* sensibilizza le cellule primarie e staminali tumorali in combinazione ai convenzionali trattamenti chemioterapici alla morte cellulare o alla riduzione della massa tumorale.

L'analisi del trascritto della survivina nello xenograft trattato con l'oxaliplatino e il neutralizzante dell' IL-4 ha rivelato una diminuita espressione rispetto agli elevati livelli mostrati nelle cellule differenziate tumorali del colon (Fig.8A). Allo stesso modo, il western blot mostra la massiva riduzione dei livelli della survivina nello xenograft trattato paragonata all'espressione mostrata nelle cellule primarie e nelle differenziate dalle sfere tumorali di colon (Fig.8B). L'indagine microscopica di adenocarcinomi del colon mostra un'espressione della survivina prevalentemente a livello citoplasmatico e raramente a livello nucleare. Nei

tumori generati nel sottocute di topo non trattato o trattato solo con l'oxaliplatino, si è evidenziata un'espressione citoplasmatica della survivina nella quasi totalità delle cellule; sorprendentemente in seguito al trattamento della singola citochina o in combinazione con l'oxaliplatino, l'espressione diventa per lo più nucleare (Fig.8C).

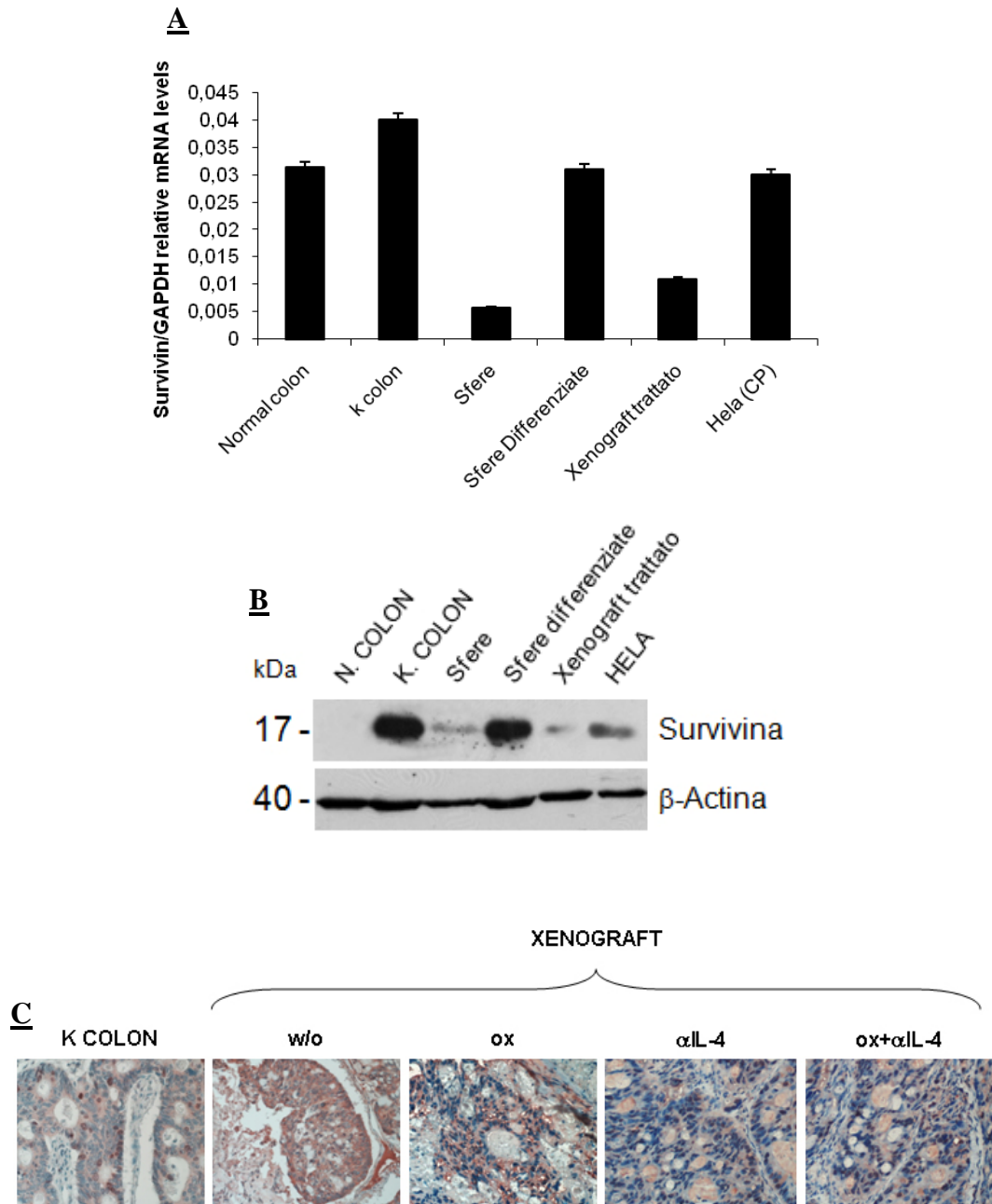


Fig.8 **A** Real time PCR della survivina nei campioni di colon e nello xenograft trattato con α -IL-4 e oxaliplatino; **B** Espressione della survivina nei campioni di colon e nello xenograft trattato con α -IL-4 e oxaliplatino; **C** Espressione della survivina nel tumore al colon e negli xenograft trattati *in vivo*.

DISCUSSIONE

Il trattamento d'elezione del carcinoma del colon è la terapia chirurgica seguita dalla radioterapia o chemioterapia. Sebbene la sopravvivenza dei pazienti in quest'ultimi anni migliorano, i farmaci citotossici sono risolutivi solo in una minoranza di pazienti; nella maggior parte dei casi infatti l'efficacia della chemioterapia è parziale e transitoria. Una migliore conoscenza degli eventi molecolari coinvolti nella progressione tumorale e delle caratteristiche biologiche delle cellule tumorali ha consentito di identificare le cause del fallimento terapeutico della chemioterapia, il quale è attribuibile in gran parte alla resistenza farmacologica acquisita secondaria, all'instabilità genetica, alla eterogeneità cellulare e mutazioni epigenetiche. Nell'ultima decade sono state pertanto identificate e sviluppate nuove strategie terapeutiche antitumorali, comprendenti nuove forme di immunoterapie, neutralizzazione di specifici fattori di crescita tumorale, terapia genica e inibizione dell'angiogenesi. Più recentemente, è stato dimostrato che altri fattori possono influenzare la risposta cellulare alla chemioterapia come l'incapacità di attivare la risposta apoptotica. Infatti le cellule resistenti possono presentare un'alterata espressione di proteine coinvolte nell'apoptosi e/o regolazione del ciclo cellulare (p53, bcl-2, cicline).

E' stato recentemente dimostrato che la produzione autocrina dell'interleuchina 4 (IL-4), possa da sola indurre resistenza all'apoptosi nelle cellule tumorali di tiroide, mammella, polmone e colon [21], e più recentemente nelle cellule staminali tumorali di colon [2] e aumentando l'espressione di proteine anti-apoptotiche come PED, cFLIP, Bcl-xL e Bcl-2. Allo stesso modo l'aggiunta esocrina di IL-4 alle cellule epiteliali sane degli stessi istotipi ha conferito un aumento delle suddette proteine anti-apoptotiche, dimostrando che IL-4 agisce come fattore di crescita e di sopravvivenza per le cellule tumorali rendendole resistenti ai convenzionali trattamenti chemioterapici. Inoltre è stato dimostrato che la neutralizzazione

dell'IL-4, mediante un anticorpo capace di legarsi alla quota di citochina libera, ha sensibilizzato le cellule staminali tumorali di colon e cellule epiteliali tumorali alla morte cellulare indotta da TRAIL o dalla chemioterapia specifica bloccandone la crescita e la progressione tumorale [2, 21]. Da questi studi è emersa una nuova strategia terapeutica antitumorale in cui la neutralizzazione di una singola citochina è necessaria e sufficiente a rendere le cellule epiteliali e staminali tumorali di colon sensibili ai convenzionali trattamenti chemioterapici.

E' stato nostro interesse studiare se la survivina, anch'essa molecola antiapoptotica, possa essere regolata dall'IL-4. La survivina è una proteina identificata per la prima volta da Altieri, e in quest'ultima decade, sono stati numerosi i lavori atti a comprendere le numerose caratteristiche della proteina, risultati a volte discordanti e comunque che necessitano di ulteriori studi. L'espressione, la funzione e la localizzazione della survivina, così come le sue varianti di splicing, risultano tuttora difficili da comprendere per le svariate possibilità che si manifestano con il susseguirsi dei lavori.

L'espressione nelle prime fasi embrionali e fetali, la sua scomparsa e la ricomparsa solo nelle cellule tumorali, le ha conferito la definizione di marcatore tumorale. Secondo alcuni lavori, la duplice funzione, anti-apoptotica e mitotica, si è vista correlata alla sua localizzazione intracellulare; la funzione anti-apoptotica sembra essere espletata dalla forma citoplasmatica mentre la funzione mitotica da quella nucleare. E' stato visto anche che la diversa localizzazione intracellulare è associata alle differenti varianti di splicing ed il ruolo che esse devono svolgere nella cellula tumorale [24].

Il primo dato importante di questo studio è risultato dalla presenza della survivina, sia del messaggero che della proteina, negli sferoidi tumorali di colon. E' noto che la survivina è espressa in cellule in attiva proliferazione e che invece le cellule staminali si trovano nella fase quiescente del ciclo cellulare. La sua espressione può essere spiegata da due diversi punti

di vista, innanzitutto gli sferoidi sono composti da una popolazione cellulare in differenti stadi, dalle vere e proprie cellule staminali (quiescenti) a progenitori o a cellule differenziate (in divisione), ed inoltre questi sferoidi sono di origine tumorale, ed è ormai ampiamente dimostrato che la survivina è espressa ad elevate quantità soltanto nelle cellule tumorali.

La forma attiva della survivina è rappresentata dalla forma fosforilata sul sito di treonina-34, un punto strategico per le funzioni della proteina, i cui livelli di espressione sono risultati elevati e proporzionali alla forma wild-type, mostrando quindi una totale attività della survivina nei campioni presi in studio.

E' stato recentemente riportato che nel tumore alla mammella, l'interleuchina 6 porta ad un aumento diretto dei livelli della survivina dopo fosforilazione di STAT-3, legandosi al suo promotore [25]. Quindi abbiamo valutato se allo stesso modo l'IL-4 può modulare direttamente l'espressione della survivina attraverso l'attivazione di STAT-6. Il legame dell'IL-4 al suo recettore determina l'attivazione di JAK-1 e JAK-3 inducendo una rapida fosforilazione tirosina chinasi dipendente della proteina costitutiva STAT-6, che omodimerizza e trasloca nel nucleo dove stimola la trascrizione di molecole anti-apoptotiche come Bcl-2, Bcl-xL e cFLIP.

Abbiamo dimostrato tramite saggi *in vitro*, in cui le cellule sono state trattate con IL-4 o il neutralizzante dell'IL-4 che la via di trasduzione con il reclutamento a valle di STAT-6 e la sua attivazione in seguito alla fosforilazione, è funzionale sia negli sferoidi che nelle cellule differenziate da esse. In particolare, abbiamo osservato l'espressione delle forme wild-type e fosforilate sia di STAT-6 che della survivina aumentano dopo trattamento con l'IL-4 e si riducono invece con α -IL-4. Per dimostrare se l'attivazione della survivina è direttamente correlata dall'attivazione di STAT-6 e quindi mediata dall'IL-4, è stato utilizzato un farmaco, la leflunomide, capace di inibire la fosforilazione della proteina STAT-6 e quindi di bloccare la sua traslocazione nel nucleo, dove normalmente si lega al promotore della survivina.

L'analisi proteica di fosfo-STAT-6, in seguito al trattamento *in vitro* a concentrazioni crescenti del farmaco, ha mostrato nelle sfere una riduzione significativa alla dose massima di 200 μ M; mentre nelle cellule differenziate da sfere la stessa concentrazione portava ad una completa scomparsa di fosfo-STAT-6. Quindi la scelta della concentrazione della leflunomide da usare nei successivi esperimenti è stata condotta preferendo il valore dell'Ic50 in modo da avere il 50% di cellule vive per i successivi esperimenti che prevedevano dei co-trattamenti con l' α -IL-4 o l'oxaliplatino.

Il trattamento non ha portato ad una variazione dei livelli di espressione della survivina nè della sua forma fosforilata, ma bensì ha mostrato, inaspettatamente, una modulazione sulla localizzazione di entrambe le proteine nelle cellule. Infatti negli sferoidi e nelle cellule differenziate tumorali di colon, la survivina, wild-type e la sua forma attiva, risulta principalmente espressa nel citoplasma. Soltanto in una piccola percentuale di cellule è espressa a livello nucleare a causa di cellule in fase mitotica. Il trattamento con la leflunomide, ha mostrato una localizzazione della survivina e della forma fosforilata esclusivamente a livello nucleare. Studi *in vivo* hanno precedentemente dimostrato che il trattamento con il neutralizzante dell'IL-4 in combinazione con il chemioterapico convenzionalmente utilizzato nei trattamenti del tumore al colon porta ad una massiva riduzione della massa tumorale nei topi immunodepressi, grazie alla sensibilizzazione delle cellule alla morte per apoptosi. In accordo a questi lavori, il co-trattamento con l' α -IL-4 e l'oxaliplatino ha visto la riduzione dei livelli della survivina negli xenograft generati dall'iniezione di cellule staminali tumorali di colon [2]. I livelli della survivina sia a livello trascrizionale che proteico si sono notevolmente ridotti rispetto ai livelli mostrati nelle cellule differenziate dagli sferoidi tumorali di colon. L'analisi di immunistochemica ha mostrato una localizzazione citoplasmatica nel tumore al colon, nello xenograft non trattato e in quello trattato con l'oxaliplatino, mentre negli xenograft trattati con il neutralizzante da solo o in

combinazione con il chemioterapico, la localizzazione della survivina è esclusivamente a livello nucleare. Questi risultati sono in accordo con la letteratura in cui si mostra che la presenza della survivina nel nucleo migliora la prognosi dei pazienti affetti da tumore alla mammella [26] e quindi la neutralizzazione di una singola citochina sposta la survivina nel compartimento più idoneo a mandare i messaggi di morte.

Recenti risultati suggeriscono che la survivina nucleare influenza la trascrizione di geni coinvolti nello sviluppo, senescenza e apoptosi mediante meccanismi ancora sottoposti a studio che comunque hanno come risultato ultimo la fosforilazione e l'attivazione di fattori di trascrizione come c-myc e SP1 (specific protein 1). Perciò, una predominante localizzazione nucleare potrebbe partecipare all'attivazione dell'apoptosi attraverso l'aumento di trascrizione di geni pro-apoptotici [9].

I risultati di questo studio dimostrano una reale connessione tra l'IL-4 e la survivina tramite la via JAK-1/STAT-6. Essa però non è sufficiente a modificare i livelli di espressione della survivina in modo diretto come è stato dimostrato con STAT-3, è possibile pensare ad un coinvolgimento di altri pathway, come la via PI3K/Akt. L'inibizione della fosforilazione di STAT-6 così come la neutralizzazione dell'IL-4 portano ad una differente localizzazione della survivina che può essere spiegato da un trasporto attivo della proteina dal citoplasma al nucleo oppure da un accumulo della stessa nel nucleo come risultato della riduzione della quota citoplasmatica.

BIBLIOGRAFIA

1. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 111-5.
2. Todaro, M., et al., *Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(4): p. 389-402.
3. Altieri, D.C. and P.C. Marchisio, *Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer*. Lab Invest, 1999. **79**(11): p. 1327-33.
4. Caldas, H., et al., *Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death*. Oncogene, 2005. **24**(12): p. 1994-2007.
5. Ogura, A., et al., *Radiation-induced apoptosis of tumor cells is facilitated by inhibition of the interaction between Survivin and Smac/DIABLO*. Cancer Lett, 2008. **259**(1): p. 71-81.
6. Engelsma, D., et al., *Homodimerization antagonizes nuclear export of survivin*. Traffic, 2007. **8**(11): p. 1495-502.
7. O'Connor, D.S., et al., *Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13103-7.
8. Wall, N.R., et al., *Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis*. Cancer Res, 2003. **63**(1): p. 230-5.
9. Knauer, S.K., et al., *Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin*. Faseb J, 2007. **21**(1): p. 207-16.
10. Altieri, D.C., *Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer*. Prog Cell Cycle Res, 2003. **5**: p. 447-52.
11. Altieri, D.C., *The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(6): p. 609-15.
12. Donovan, P.J. and J. Gearhart, *The end of the beginning for pluripotent stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 92-7.
13. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
14. Robin, C., et al., *Identification of lymphomyeloid primitive progenitor cells in fresh human cord blood and in the marrow of nonobese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice transplanted with human CD34(+) cord blood cells*. J Exp Med, 1999. **189**(10): p. 1601-10.
15. Rochat, A., K. Kobayashi, and Y. Barrandon, *Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis*. Cell, 1994. **76**(6): p. 1063-73.
16. Booth, C. and C.S. Potten, *Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1493-9.
17. Bianco, P. and P. Gehron Robey, *Marrow stromal stem cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1663-8.
18. Klonisch, T., et al., *Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications*. Trends Mol Med, 2008. **14**(10): p. 450-60.
19. Renault, V., et al., *Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock*. Exp Gerontol, 2000. **35**(6-7): p. 711-9.
20. Stassi, G., et al., *Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6784-90.
21. Todaro, M., et al., *Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4*. Cell Death Differ, 2008. **15**(4): p. 762-72.
22. Todaro, M., et al., *Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1491-9.

23. Gonzalez-Alvaro, I., et al., *Inhibition of TNF and IL-17 production by leflunomide involves the JAK/STAT pathway*. Ann Rheum Dis, 2008.
24. Mahotka, C., et al., *Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants*. Cell Death Differ, 2002. **9**(12): p. 1334-42.
25. Gritsko, T., et al., *Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(1): p. 11-9.
26. Kennedy, S.M., et al., *Prognostic importance of survivin in breast cancer*. Br J Cancer, 2003. **88**(7): p. 1077-83.