

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA



Dottorato XXXII ciclo

Corso di BIOTECNOLOGIE IN MEDICINA TRASLAZIONALE

Curriculum: Medicina Rigenerativa ed Ingegneria dei Tessuti

**Studio dei fattori responsabili  
dell'alterazione del metabolismo osseo nella  
Leucemia Linfatica Cronica: specifico ruolo di  
HGF nel microambiente stromale**

Tesi di Dottorato

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. Giannoni', written in a cursive style.

*Dottorando: Francesca Puglisi*

*Tutor: Prof. Paolo Giannoni*

*Coordinatore: Prof. Rodolfo Quarto*

# SOMMARIO

pag.	3	<b>SCOPO DEL PROGETTO</b>
pag.	5	<b>INTRODUZIONE</b>
pag.	5	... L'osteogenesi
pag.	6	... La Leucemia Linfatica Cronica
pag.	8	... La cellula di Leucemia Linfatica Cronica in vivo
pag.	12	... L'Hepatocyte Growth Factor (HGF) e il suo recettore c-Met
pag.	17	... Studi precedenti
pag.	19	... Obiettivo dello studio
pag.	21	<b>MATERIALI E METODI</b>
pag.	21	... Colture cellulari
pag.	22	... Osteoinduzione e trattamento delle hBMSC
pag.	23	... Analisi di espressione genica
pag.	27	... Analisi dei fattori trascrizionali coinvolti nel controllo dell'espressione di HGF
pag.	36	<b>RISULTATI</b>
pag.	36	... 1. Inibizione dell'espressione dei marker di differenziamento osteogenico nelle hBMSC a seguito di esposizione a cellule, a siero o a terreno condizionato derivato da cellule B di CLL
pag.	40	... 2. L'esposizione di monociti al mezzo condizionato di coltura di cellule B di CLL stimola l'osteoclastogenesi
pag.	42	... 3. Influenza delle hBMSC sulle cellule B di CLL
pag.	44	... 4. Identificazione dei fattori di trascrizione responsabili della regolazione di HGF
pag.	51	<b>DISCUSSIONE</b>
pag.	58	... Conclusioni e sviluppi futuri
pag.	61	<b>BIBLIOGRAFIA</b>

# ***SCOPO DEL PROGETTO***

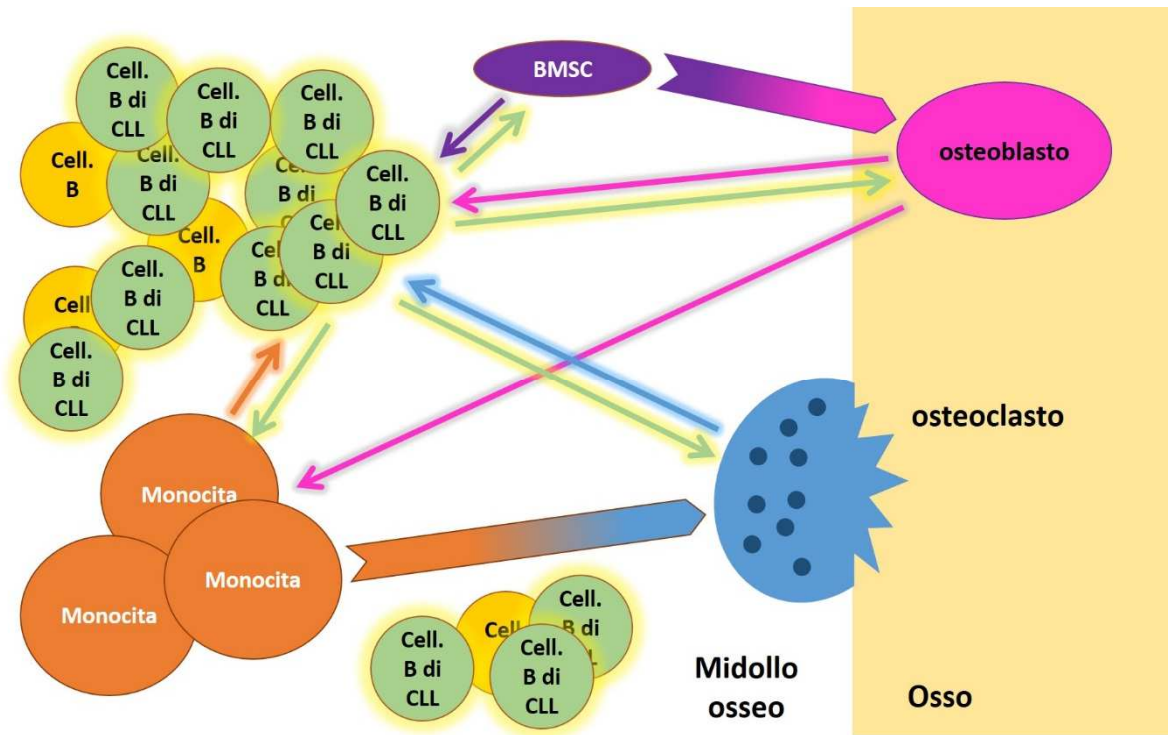
La Leucemia Linfatica Cronica (CLL) è la leucemia più comune nel mondo Occidentale. Colpisce principalmente dopo i 50 anni ed è caratterizzata dalla proliferazione e l'accumulo di linfociti B maturi CD5+ nel sangue periferico, nei linfonodi e nel midollo osseo.

Le cellule leucemiche di CLL in vitro non sopravvivono, andando incontro ad apoptosi, fenomeno che inficia la possibilità di disporre di modelli sperimentali su cui studiare approcci farmacologici mirati. Al contrario, in vivo è proprio la sopravvivenza a lungo termine nei distretti linfonodali e nel midollo osseo a causare le ricadute di malattia e la sua difficile eradicabilità nei pazienti affetti.

Una delle conseguenze di questo accumulo e della progressione della malattia, è un'alterazione della struttura trabecolare dell'osso, evidenziata tramite analisi tomografiche in pazienti a stadi intermedi ed avanzati della patologia.

Queste premesse portano ad ipotizzare che il microambiente midollare, ed in particolare la sua componente figurata delle cellule midollari stromali (Bone Marrow Stromal Cells, BMSC), tramite i contatti cellula-cellula e i segnali cellulari secreti, sia in grado di permettere e promuovere la sopravvivenza dei cloni leucemici; a loro volta le cellule di leucemia sembrano influenzare l'ambiente circostante, alterando così il metabolismo osseo e la sua normale omeostasi. Sembra quindi instaurarsi uno scambio incrociato di segnali tra le cellule leucemiche e le cellule della nicchia midollare, con modificazioni sostanziali in entrambe le direzioni.

Scopo di questo progetto è quindi investigare la natura di questo cross-talk, in particolare da una parte approfondendo il ruolo dell'Hepatocyte Growth Factor (HGF) e della sua regolazione nella sopravvivenza della cellula di CLL, dall'altra verificando attraverso quali meccanismi e segnali il clone leucemico è in grado di alterare il metabolismo osseo.



**Figura 1:** alcune delle cellule presenti nella nicchia midollare. Le BMSC sono in grado di differenziare in osteoblasti. Questi, tramite citochine, inducono il differenziamento dei monociti in osteoclasti. Le cellule B di CLL accumulate nel midollo osseo possono in qualche modo influire su questi meccanismi, ed essere a loro volta influenzate dalle cellule della nicchia.

# ***INTRODUZIONE***

## ***L'osteogenesi***

Il sistema scheletrico è caratterizzato dal mantenimento di un equilibrio dinamico tra la formazione del tessuto osseo e il suo riassorbimento, processi a carico rispettivamente degli osteoblasti e degli osteoclasti.

Il ruolo principale nella deposizione della matrice ossea è giocato dagli osteoblasti, cellule che si differenziano a partire dalle cellule stromali del midollo osseo (Bone Marrow Stromal Cells, BMSC, in grado di dare origine anche ad altri tipi cellulari, quali condrociti, adipociti o mioblasti) [Pittenger MF et al. 1999]. Questi precursori vanno inizialmente incontro ad un processo di condensazione mesenchimale, che li porta a concentrarsi in zone vascolarizzate e a proliferare, differenziando in un unico tipo cellulare [Hall BK et al. 1992; Smith MM et al. 1990]. L'osteoblastogenesi comprende tre fasi: osteoprogenitori, preosteoblasti e osteoblasti. Gli osteoprogenitori sono il frutto della proliferazione iniziale, le cui divisioni portano alla formazione, tra le due cellule figlie, di una cellula staminale, che permette l'auto-rinnovamento [Watt FM et al. 2001]. I preosteoblasti sono invece caratterizzati da un'intensa proliferazione, che però dà origine solo a cellule già indirizzate al differenziamento, e dall'iniziale deposizione di matrice, a partire dalla componente proteica (soprattutto Collagene I) [Gronthos S et al. 1999]. Gli osteoblasti infine hanno scarsa capacità proliferativa e sono maggiormente preposti alla deposizione delle altre molecole della matrice, che portano alla sua mineralizzazione [Stein GS et al. 1996]. Essi completano infine la maturazione una volta che rimangono circondati da tale matrice, diventando osteociti [Nardone V et al. 2014].

Gli osteoblasti svolgono inoltre un ruolo fondamentale nella regolazione del differenziamento dei monociti in osteoclasti, tramite il segnale paracrino denominato RANKL, ligando del recettore RANK (Nuclear Factor- $\kappa$ B,) espresso dai monociti. RANKL, insieme al Fattore Stimolante la formazione di Colonie Macrofagiche (M-CSF), prodotto da diverse cellule nel microambiente osseo, tra cui le cellule stromali, le cellule T e gli stessi osteoblasti, induce il differenziamento in senso osteoclastico dei monociti. Gli osteoblasti hanno inoltre la possibilità di inibire

l'osteoclastogenesi producendo la citochina Osteoprotegerina (OPG), in grado di legare RANKL e impedirne il legame con RANK [Nardone V et al. 2014; Yavropoulou MP et al. 2008]. L'equilibrio tra RANKL libero e RANKL legato alla OPG è quindi responsabile del tasso di differenziamento degli osteoclasti.

Gli osteoclasti sono cellule multinucleate deputate al riassorbimento della matrice ossea e hanno origine dal differenziamento e la fusione di cellule staminali ematopoietiche e di monociti. Il processo di differenziamento è innescato dai segnali paracrini M-CSF e, soprattutto, RANKL [Boyce BF et al. 2015; Hsu H et al. 1999; Boyce BF et al. 2007].

Essi svolgono la loro funzione, che ha fine solo alla morte della cellula per apoptosi, aderendo alla superficie interna dell'osso e rilasciando su di esso enzimi in grado di degradare sia la componente minerale che quella proteica della matrice ossea [Teitelbaum SL et al. 2000]. Il riassorbimento osseo, necessario per il rimodellamento, può anche essere stimolato in caso di ipocalcemia (bassi livelli serici di calcio) dall'ormone paratiroideo (PTH), che stimola gli osteoblasti al rilascio di RANKL [Chen HT et al. 2012].

## ***La Leucemia Linfatica Cronica***

La Leucemia Linfatica Cronica (CLL) è la leucemia più comune nel mondo occidentale. E' detta "Leucemia dell'anziano" poiché colpisce pazienti aventi età media compresa tra 67 e 72 anni, ha un'incidenza che cresce con l'aumentare dell'età ed è maggiore negli uomini che nelle donne (in rapporto 1,7:1) [Molica S et al. 2006; Morton LM et al. 2001; Watson L et al. 2008].

E' caratterizzata dall'accumulo di linfociti B maturi CD5+ nel sangue, nei linfonodi, nella milza e nel midollo osseo [Rozman C et al. 1995]. Alcuni studi hanno evidenziato il fatto che la CLL possa avere origine da cellule ancora allo stadio di staminali ematopoietiche (HSC), quindi multi-potenti e con un alto tasso di replicazione [Kikushige Y et al. 2011].

Al giorno d'oggi non esistono ancora cure per questa malattia, ma è possibile ricorrere a trattamenti spesso efficaci per il suo contenimento [Hallek M, 2017].

Tra le cause più frequenti della malattia sono state individuate alterazioni cromosomiche, tra cui le più comuni sono del(13q), del(11q), trisomia 12 e del(17)p. Un successivo accumulo di mutazioni contribuisce ad aumentarne l'aggressività, andando a colpire principalmente pathway come il processamento e trasporto dell'RNA, l'attività di MYC, il signaling di MAPK e l'attività di proteine con ruolo fondamentale nella riparazione del DNA (tra le più comuni mutazioni troviamo quelle riguardanti i geni NOTCH1, MYD88, TP53, ATM, ...) [Landau DA et al. 2015; Puente XS et al. 2011; Puente XS et al. 2015; Jackson SP et al. 2009].

## ***La cellula di Leucemia Linfatica Cronica in vivo***

La sopravvivenza in vitro delle cellule di CLL è limitata nel tempo, a causa dell'insorgenza di fenomeni apoptotici che riducono notevolmente la portata e la significanza dei modelli sperimentali ex vivo della malattia. Al contrario, queste cellule sopravvivono a lungo in vivo nelle sedi linfonodali e nel midollo osseo dei pazienti, causando recidive e limitando la completa guarigione dalla patologia. Il microambiente in cui le cellule di CLL si vengono a trovare in vivo, dunque, è in grado di fornire elementi utili ad impedirne l'apoptosi, a garantirne la sopravvivenza ed a promuoverne la proliferazione. Gli elementi figurati del microambiente, in grado di operare in questo modo, agiscono sulla cellula B di CLL tramite contatti cellula-cellula e la secrezione di chemochine e citochine, e sono rappresentati dalle cellule presenti nelle nicchie midollari, come per esempio le cellule T, i macrofagi, le cellule dendritiche follicolari, le stromali midollari, le Nurse-like cells (NLC), i fibroblasti e gli osteoblasti [Burger JA et al. 2009; Giannoni P et al. 2011; Giannoni P et al. 2014; Chiorazzi N et al. 2005; Reinart N et al. 2013].

Il sangue periferico è solo una parte del ciclo vitale delle cellule di CLL [Messmer BT et al. 2005]. L'osservazione che la maggior parte delle cellule di CLL circolanti sono fuori dal ciclo cellulare, ma sono andate incontro ad un significativo numero di divisioni, come dimostrato dall'accorciamento dei telomeri, ha progressivamente suggerito la ripartizione della malattia in un comparto circolante non-proliferativo e in uno proliferativo residente in un tessuto. Le cellule di CLL migrano dal sangue periferico fino ai compartimenti tissutali (midollo osseo, linfonodi e milza), dove affrontano complesse interazioni cellulari e molecolari, ancora non del tutto

conosciute, con le cellule stromali e la matrice, collettivamente definite "microambiente". L'architettura degli organi linfoidei primari e secondari nella CLL appare alterata dalla progressiva infiltrazione delle cellule leucemiche in questi organi. Le cellule B leucemiche infatti sembrano avere una proliferazione competitiva e un vantaggio nella sopravvivenza, rispetto ai normali progenitori e alle cellule B, che sono dipendenti in parte dall'interazione tra i recettori delle cellule B (BCR) e gli antigeni, e in parte dai fattori recepiti nel microambiente. L'estensione dell'infiltrazione correla con il peggioramento della prognosi, e nel midollo osseo segue un andamento che può essere diffuso, interstiziale, nodulare o misto tra interstiziale e nodulare [Montserrat E et al. 1984; Pangalis GA et al. 1987; Pangalis GA et al. 1984]. Una sostituzione estensiva del midollo è generalmente associata con una malattia aggressiva. I linfonodi e la milza mostrano tipicamente una diffusa infiltrazione e nella CLL, al contrario degli altri tumori delle cellule B, i tessuti linfoidei sviluppano pseudo-follicoli che sono chiamati "centri di proliferazione". In essi, i linfociti B mostrano una morfologia para-immunoblastica e pro-linfocitica, esprimono alti livelli di CD23 e sono ricchi di Ki67, un marker di proliferazione cellulare. Le cellule del microambiente che supportano la loro vitalità comprendono le BMSC, le Nurse-like Cells (NLC) CD68+, le Cellule Dendritiche Follicolari (FDC), le cellule endoteliali e le cellule T.

Considerata l'importanza del midollo osseo nell'origine delle cellule B e dei linfonodi nella loro espansione e nel loro differenziamento, è presumibile che essi rilascino diversi segnali per la sopravvivenza cellulare. Numerosi sistemi di co-culture sono stati sviluppati per simulare il microambiente tumorale. Molti studi in vitro hanno mostrato che le BMSC possono indurre con efficacia la sopravvivenza nelle cellule di CLL [Kurtova AV et al. 2009; Giannoni P et al. 2011; Kay NE et al. 2007]. Pochi studi hanno invece valutato il coinvolgimento dei linfonodi nella patogenesi della CLL e nella resistenza ai farmaci.

L'influenza del microambiente di diversi tessuti sulla biologia della CLL è stata oggetto di studio [Herishanu Y et al. 2011]. Confrontando il profilo di espressione genica delle cellule di CLL estratte da diversi compartimenti anatomici (sangue periferico, midollo osseo e linfonodi), questi autori hanno identificato e proposto i linfonodi come il principale sito di attivazione delle cellule di CLL e di proliferazione del tumore. Quasi tutti i geni up-regolati nelle cellule residenti nel midollo osseo



rispetto alle cellule circolanti del sangue periferico, sono up-regolati anche nelle cellule residenti nei linfonodi, mentre più di 100 geni sono up-regolati in quelle residenti nei linfonodi ma non in quelle residenti nel midollo osseo. Molti dei geni sovra-espressi nei linfonodi sono noti geni target dei recettori delle cellule B (BCR), il che suggerisce e fornisce un'indicazione per l'attivazione tramite BCR delle cellule di CLL in vivo. E' inoltre interessante sottolineare che l'espressione dei geni target dei BCR sembra maggiore nella CLL più aggressiva. In un altro studio è stata fornita la prova diretta che le cellule non proliferanti del sangue periferico sono derivate clonalmente dalle cellule che sono proliferate nei linfonodi e che, quando le cellule di CLL sono trasferite nei topi, le cellule leucemiche hanno una maggiore tendenza a migrare e localizzare nei linfonodi che nel midollo osseo [Vandewoestyne ML et al. 2011].

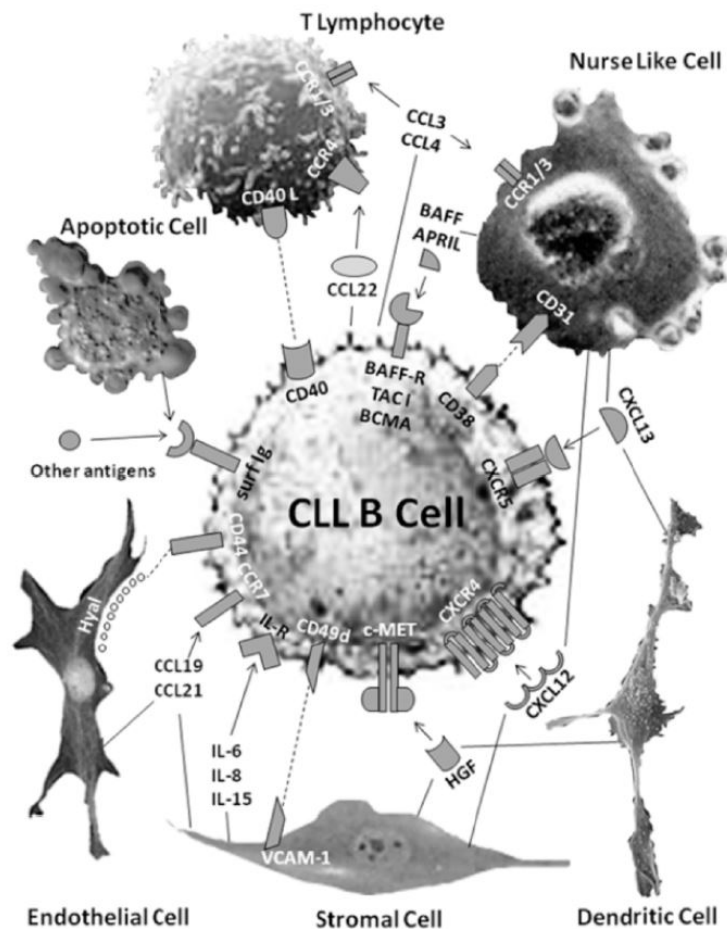
All'interno degli pseudo-follicoli, che rappresentano un elemento caratteristico della CLL, e che sono un compartimento proliferativo presente nei linfonodi e, in quantità minore, nel midollo osseo dei pazienti di CLL, si trova un alto numero di cellule T che esprimono CD40L (CD154), che può legare CD40 sulle cellule di CLL, proteggendole dall'apoptosi [Kitada S et al. 1999]. L'attivazione delle cellule di CLL tramite CD40 può tuttavia dare diversi esiti, dato che i cross-linking di CD40, inducendo up-regolazione di CD80 e CD54, possono trasformare cellule di CLL non-immunogeniche in effettive cellule T stimolatrici [Ranheim EA et al. 1993]. Un lavoro successivo è stato progettato per imitare le cellule di CLL dei linfonodi e il microambiente vascolare. Tre diversi sistemi di co-culture in vitro sono state sviluppati utilizzando fibroblasti embrionali di topo transfettati con CD40L o CD31, oppure la linea cellulare di cellule endoteliali microvascolari umane HMEC [Hamilton E et al. 2012]. Anche se tutti e tre i sistemi sono risultati citoprotettivi e hanno favorito la sopravvivenza delle cellule di CLL, è stata messa in luce la complessità delle differenze che possono essere indotte seguendo le diverse interazioni ligando/recettore da diverse cellule stromali.

Nel complesso quindi risulta evidente come si debbano ancora chiarire completamente gli effetti e la complessa rete delle interazioni tumore-cellula ospite che possono realmente avere luogo in vivo all'interno degli organi linfoidi secondari e al midollo osseo.

Diversi fattori e segnali forniti dal microambiente sono stati perciò identificati come coinvolti nella protezione delle cellule di CLL dall'apoptosi e nel supportare l'espansione dei cloni leucemici: questi pathway sono ora riconosciuti come i principali contribuenti per la patogenesi della malattia e come potenziali target terapeutici. Tali fattori includono chemochine e citochine, integrine e altre molecole di adesione, BAFF e APRIL, CD40, HGF e i BCR. Diversi fattori inducono effetti pleiotropici e pathway di segnalazione intracellulare simili (PI3K/AKT/mTor, MAPK, STAT3, NF- $\kappa$ T, SYK, BTK), cosicché risulta difficile stimare fino a che punto ogni singolo fattore o pathway può essere necessario o sufficiente per la patogenesi della CLL.

In conseguenza di queste scoperte, alcuni dei farmaci introdotti negli anni recenti nella cura della malattia (es: ibrutinib e idelasib) hanno tra i loro bersagli proprio il microambiente che circonda in vivo le cellule di CLL [Fiorcari S et al. 2016; Herman SE et al. 2015; Maffei R et al. 2015].

Lo studio del microambiente ha dunque aggiunto nuove componenti molecolari solubili in grado di interferire con cellule di CLL ed il loro ciclo vitale. Tra le citochine individuate più di recente c'è anche il fattore di crescita degli epatociti (Hepatocyte Growth Factor; HGF), in grado di svolgere un ruolo primario in questi meccanismi [Giannoni P et al. 2011; Giannoni P et al. 2014], di cui si discuterà più avanti in dettaglio.



**Figura 2:** Comunicazione tra le cellule di CLL e le cellule presenti nel microambiente midollare o linfonodale. Sono mostrate diverse interazioni che hanno luogo tra la cellula leucemica e gli altri tipi cellulari che la proteggono dall'apoptosi. Le Bone Marrow Stromal Cells (BMSC) e le Nurse-like Cells (NLC) producono CXCL12, coinvolto nella sopravvivenza e nella migrazione della cellula di CLL. Le NLC inoltre inducono la sopravvivenza della cellula leucemica attraverso BAFF, APRIL e i loro recettori (BAFF-R, TACI, BCMA) o attraverso l'interazione CD31/CD38. Le cellule dendritiche e stromali producono HGF, che interagisce con c-MET, o CXCL13, che interagisce con CXCR5, presente sulla cellula di CLL. Il contatto tra cellula di CLL e MSC può anche essere stabilito attraverso l'interazione VCAM-1 e CD49d sulla cellula leucemica. Le cellule T, che esprimono CD40L, inducono la sopravvivenza delle cellule di CLL dopo l'interazione con CD40, mentre CCL3/4 o CCL22, secreti dalle cellule leucemiche attivate, reclutano cellule T e NLC verso le nicchie di cellule B di CLL. Anche l'acido ialuronico delle membrane basali delle cellule endoteliali può interagire con le cellule B di CLL. Inoltre, antigeni rilasciati dalle cellule apoptotiche possono stimolare le Ig di superficie espresse dalle cellule leucemiche, amplificando quindi la responsività delle cellule di CLL agli altri segnali provenienti dal microambiente. [Da Giannoni P e de Toter D, *Frontiers in Clinical Drug Research: Hematology*, Vol. 1, 2014, 3-41, Chapter 1].

Altre evidenze portano ad ipotizzare che l'influenza tra cellule di CLL e il microambiente sia reciproca: nei pazienti in stadi intermedi ed avanzati della malattia si riscontra infatti spesso un'erosione della struttura ossea a livello delle ossa lunghe dovuta alla diminuzione del tessuto osseo trabecolare, evidenziabile tramite tomografia computerizzata, con conseguente indebolimento della struttura [Fiz F et al. 2014; Marini C et al. 2017]. I meccanismi che causano quest'alterazione della normale omeostasi del tessuto osseo sono al momento ancora scarsamente conosciuti. Uno studio svolto in precedenza ha iniziato ad indagarli, mettendo in luce il legame tra i livelli di espressione di RANKL nelle cellule di CLL e il grado di erosione dell'osso nei pazienti [Marini C et al. 2017]. RANKL, come già descritto, è una proteina espressa dagli osteoblasti ed è la principale citochina coinvolta nel differenziamento degli osteoclasti. Un'elevata espressione di RANKL si riscontra anche in altre patologie, come per esempio il Mieloma Multiplo (MM). In questo caso però l'alta espressione di RANKL da parte delle cellule maligne coincide con un suo eccessivo rilascio, con conseguente aumento di stimolazione dell'attività osteoclastica e forte riassorbimento osseo. Al contrario le cellule di CLL sembrano sovraesprimere RANKL senza però rilasciarlo nel microambiente [Bataille R et al. 1989; Roodman GD et al. 2009; Valentin-Opran A et al. 1982; Schmiedel BJ et al. 2013]. L'alterazione della struttura ossea nella CLL sembra quindi la conseguenza di un diverso tipo di meccanismo ancora da indagare.

## ***L'Hepatocyte Growth Factor (HGF) e il suo recettore c-Met***

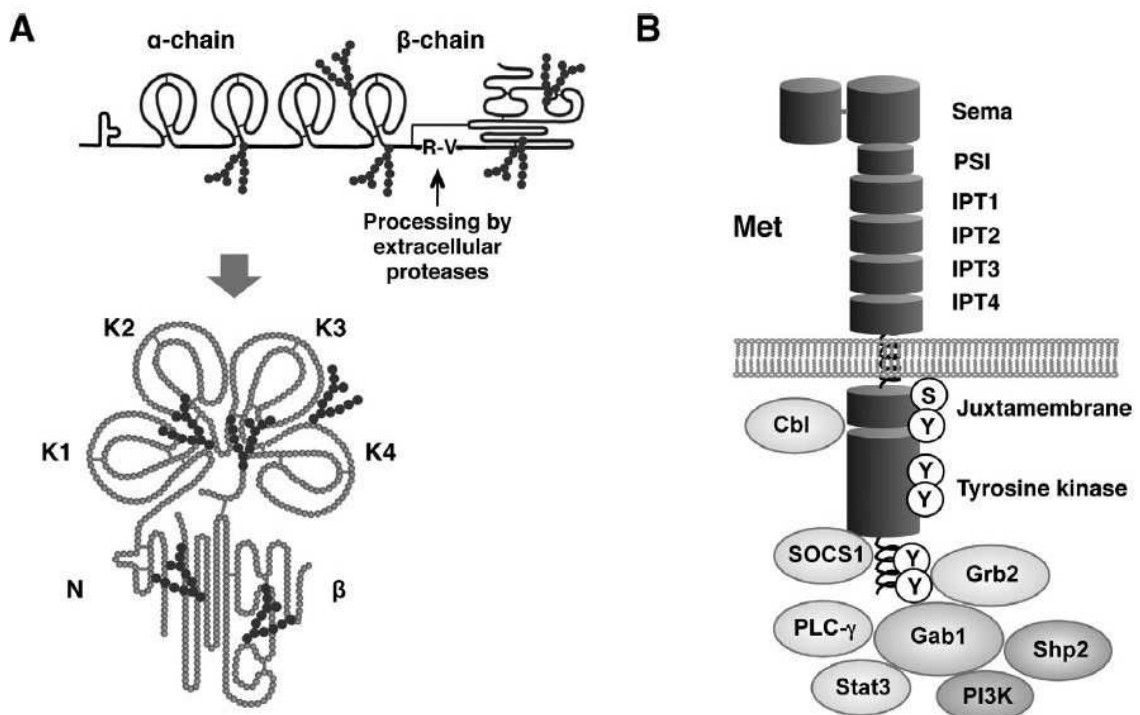
L'Hepatocyte Growth Factor è un segnale paracrino secreto principalmente dalle cellule mesenchimali [Zarnegar R, 1995].

Esso agisce da fattore di crescita per i tessuti di numerosi organi e sistemi, tra i quali fegato, reni, pelle, pancreas, sistema nervoso, cuore e sistema immunitario, e ha un importante ruolo in processi di mitogenesi, motilità cellulare, morfogenesi e rigenerazione tissutale [Imamura R et al. 2017].

E' anche in grado di regolare negativamente alcune vie anti-apoptotiche [Hu ZX et al. 2010; Ma J et al. 2014]: questo, insieme alla sua capacità di stimolare

l'angiogenesi [Grant DS et al. 1993; Ding S et al. 2003] e la migrazione cellulare, gli conferiscono un ruolo importante anche nella tumorigenesi e nell'invasione tumorale.

HGF è una proteina glicosilata, secreta come un'unica sequenza polipeptidica detta proHGF, che viene poi idrolizzata in due catene di 69 KDa (con struttura ad  $\alpha$ -elica) e 34 KDa (con struttura a  $\beta$ -foglietto). Queste, unite successivamente da un ponte disolfuro, vanno a formare la proteina eterodimerica. Pur facendo parte della famiglia di serin-proteasi S1, HGF non presenta attività proteolitica, avendo perso la Ser e la His normalmente presenti nel sito catalitico [Nakamura T et al. 1989; Gherardi E et al. 1989; Gohda E et al. 1988].



**Figura 3:** Schema delle strutture di (A) HGF e (B) c-Met. Di HGF sono anche mostrati il taglio della sequenza aminoacidica che avviene durante la maturazione del suo trascritto, tra Arg494 e Arg495, e le glicosilazioni. I domini del recettore c-Met sono espliciti nel testo. [Da Imamura R e Matsumoto K, "Hepatocyte growth factor in physiology and infectious diseases", *Cytokine* 98 (2017) 97–106].

HGF agisce attivando un signaling cellulare attraverso il legame con il recettore di membrana protein-kinasico HGFR o c-Met, codificato dal proto-oncogene c-Met. Anch'esso nasce come singola catena aminoacidica, successivamente processata per dare origine alla struttura matura, composta da una porzione a  $\beta$ -foglietto transmembrana e una ad  $\alpha$ -elica glicosilata esterna alla cellula, unite da un ponte disolfuro [Bottaro DP et al. 1991; Naldini L et al. 1991; Rodrigues GA et al. 1991]. La porzione c-terminale intracellulare è quella che svolge l'attività di trasduzione del segnale: il legame tra HGF e c-Met porta alla fosforilazione di Tirosine presenti in questa porzione, con conseguente reclutamento delle proteine segnale intracellulari Grb2, Gab1, PI3-K, Shp2, PLCc1 e Stat3 [Imamura R et al. 2017].

HGF è espresso nelle cellule di derivazione mesenchimale, mentre c-Met principalmente in quelle epiteliali (ma non solo, si trova per esempio anche in cellule ematopoietiche o nervose). Questa distribuzione garantisce la trasmissione paracrina del segnale portato da HGF [Kmiecik TE et al. 1992; Jung W et al. 1994; Zarnegar R et al. 1995].

Esiste tuttavia un'altra modalità di segnalazione attuata da HGF/c-Met, ossia una modalità autocrina, evidenziata in cellule staminali mesenchimali e in cellule tumorali [Rahimi N et al. 1996; Nishida S et al. 2013; Xie Q et al. 2012; Yi S et al. 2000]. In queste ultime, il conseguente aumento di espressione di entrambe le molecole è solitamente associato a prognosi negative [Miller CT et al. 2006; Stellrecht CM et al. 2007; Garcia S et al. 2007; Puri N et al. 2007; Peghini PL et al. 2002; Abounader R et al. 2005].

L'attività di HGF e c-Met è fondamentale per il normale sviluppo e la normale rigenerazione tissutale, mentre una loro alterata espressione è correlabile con crescita invasiva di diversi tipi di tumori, spesso con fenotipi aggressivi [Matsumoto K et al. 1994; Matsumoto K et al. 2006; Jeffers M et al. 1997]. Per questo la ricerca di inibitori dell'attività di c-Met è diventata un'importante linea di ricerca in campo oncologico [Cipriani NA et al. 2009; Comoglio PM et al. 2008; Sattler M et al. 2009; Date K et al. 1997].

La regolazione dell'attività di HGF è normalmente a carico non solo della sua espressione, ma anche delle proteasi che idrolizzano il proHGF. E' così possibile che cellule aventi una comune origine mesenchimale e una comune espressione di HGF, presentino notevoli differenze nella regolazione dell'attività del fattore di crescita. Un esempio di questo si ha in alcune cellule avente origine da stromali del midollo osseo (BMSC): condrociti e osteoblasti si differenziano da questa stesse cellule, ma, a dispetto di una pari espressione di c-Met, hanno livelli di regolazione di HGF notevolmente diversi [Bau B et al. 2004]. I condrociti presentano una bassa regolazione dell'attività di HGF, down-regolato dall'azione del TGF $\beta$  (responsabile del differenziamento delle BMSC in senso condrogenico), pur esprimendo normalmente c-Met [Neuss S et al. 2004].

Per la regolazione di HGF sono stati proposti diversi siti di legame per fattori di trascrizione (TF) sulla sua regione promotrice. Per esempio sono state individuate zone con elementi responsivi a Smad2 e Smad4 (rispettivamente con funzione inibitrice e attivatrice dell'espressione di HGF), LIF (Leukemia Inhibitory Factor), PPAR $\gamma$  (con funzione attivatrice nel tessuto adiposo), NF-1 e STAT3 [Hoot KE et al. 2010; Yin J et al. 2014; Li Y et al. 2005; Nakagawa K et al. 2013]. E' stato dimostrato che proprio dall'azione di STAT3, attivata dallo stesso HGF prodotto dal midollo osseo in pazienti malati di CLL, prende il via nelle cellule leucemiche il pathway autocrino che porta ad un'ulteriore produzione di HGF da parte delle cellule leucemiche stesse (che di solito non lo producono) [Giannoni P et al. 2011]. Questo feed-back positivo [Giannoni P et al. 2014], che ha come conseguenza l'aumento notevole della secrezione di HGF nel microambiente stromale, si riscontra anche nei linfociti B sani [Gordin M et al. 2010], che contribuiscono quindi a loro volta alla sopravvivenza delle cellule di CLL.

HGF svolge un ruolo importante anche nello sviluppo del sistema scheletrico, stimolando la proliferazione degli osteoblasti e la migrazione degli osteoclasti (oltre a modulare proliferazione e differenziamento dei condrociti e promuovere la formazione del muscolo scheletrico) [Chen HT et al. 2012; Grumbles RM et al. 1996; Proto JD et al. 2015].

Studi in vitro hanno infatti evidenziato come BMSC coltivate con aggiunta di HGF presentino un'aumentata espressione di alcuni geni marker osteogenici, come Osteocalcina, OPG, Bone Sialoprotein 2 (BSP2) e Collagene 1a1 (COL1a1), mentre la soppressione dell'attività di HGF tramite anticorpo specifico porta ad una demineralizzazione della matrice ossea, evidenziando l'importante ruolo svolto dalla citochina nell'osteogenesi [Aenlle KK et al. 2014]. Studi in vivo hanno confermato questa sua funzione [Matsubara H et al. 2008; Wen Q et al. 2012].

Il legame tra HGF e gli osteoclasti invece porta da una parte ad un feedback negativo di espressione del recettore per HGF stesso, dall'altra ad un aumento del calcio intracellulare che innesca cambiamenti nella morfologia, volti a favorire la migrazione della cellula verso la matrice ossea da riassorbire [Grano M et al. 1996].

E' interessante notare che alcuni studi riportano invece risultati contrari, ossia di inibizione dell'osteogenesi da parte di HGF, in caso di dosaggi superiori a quelli fisiologici (es: 100 ng/mL, o in caso di patologia osteoartritica) [Standal T et al. 2007; Abed E et al. 2015]. Questi studi tuttavia non indagano i meccanismi di quest'effetto inibitorio di HGF.

D'altro canto, il tessuto osseo è in grado di inibire la produzione di HGF nel sistema scheletrico: uno studio ha evidenziato come l'attivazione di RANK, che si verifica durante l'osteoclastogenesi, sia in grado di bloccare l'espressione e l'attività di HGF, con conseguente diminuzione dei processi di riparazione del muscolo scheletrico e dei livelli circolanti di HGF [Proto J D et al. 2015]. Questo meccanismo di inibizione dell'espressione di HGF potrebbe agire tramite la soppressione da parte di RANK del fattore di trascrizione PPAR $\gamma$  [Yin J et al. 2014], portando ad ipotizzare che il signaling RANKL/RANK sia in grado di inibire gli specifici livelli tissutali di HGF.



## ***Studi precedenti***

Gli studi già effettuati hanno iniziato ad indagare le cause dell'erosione ossea evidenziata nei pazienti di CLL e ad approfondire il ruolo di HGF nel microambiente midollare. Innanzi tutto hanno individuato, tra le cause dell'alterazione dell'osso trabecolare, un aumento dell'attività osteoclastogenica e una concomitante diminuzione di quella osteoblastogenica.

Gli esperimenti preliminari si sono indirizzati sull'identificazione dei fattori responsabili, nella CLL, della diminuzione del numero di cellule stromali (BMSC) che differenziano in osteoblasti, e dell'aumento del numero di monociti che differenziano in osteoclasti.

E' stato innanzi tutto verificato che l'aumento dell'attività osteoclastogenica non dipende dalla maggior concentrazione delle citochine responsabili dell'induzione dei monociti verso il differenziamento, RANKL e M-CSF, la cui concentrazione misurata nei terreni di coltura è risultata pari a quelle fisiologiche o, talvolta, quasi nulla.

L'impiego di colture di monociti indotti verso osteoclastogenesi, e contemporaneamente esposti a mezzo condizionato di cellule B di CLL, ha evidenziato un aumento nel numero di osteoclasti formati, così come verificabile attraverso il test di positività alle fosfatasi alcalina tartrato-resistente (TRAP), ancorché di dimensioni ridotte. Saggi di riassorbimento osseo hanno valutato la funzionalità degli osteoclasti ottenuti in queste condizioni, che è risultata maggiore rispetto ai monociti indotti con i soli RANKL e M-CSF. Ciò conferma, dunque, che l'influenza delle cellule di CLL induce al differenziamento di un numero maggiore di monociti, responsabili di una aumentata attività osteoclastica, seppure limitati nel loro sviluppo fisiologico rispetto alle normali condizioni.

Riguardo al ruolo di HGF nell'influenza del microambiente midollare sulle cellule di CLL, sono stati condotti esperimenti in vitro di co-cultura e crescita in transwell (quindi in assenza di contatto ma con scambio di segnali nel microambiente) tra cellule di CLL e diversi tipi di altre cellule, aventi una comune origine mesenchimale e rappresentative dei diversi elementi del midollo osseo. Questi hanno evidenziato come alcuni tipi cellulari siano in grado di contribuire alla sopravvivenza del clone leucemico. In particolare hanno mostrato questa caratteristica le hBMSC, i

fibroblasti (human fibroblasts; HF), cellule trabecolari dell'osso midollare (Trabecular Bone Marrow-Derived Cells; TBMC) e le cellule di linea MG63 (cellule osteoblasto-simili di osteosarcoma umano), mentre le cellule endoteliali e condrociti non hanno mostrato questa capacità [Giannoni P et al. 2011].

Parte degli esperimenti riguardanti HGF erano già stati effettuati: sono stati valutati innanzi tutto i livelli di espressione di HGF in cellule di CLL provenienti da diversi pazienti tramite PCR qualitativa, rilevando una grande variabilità da un campione all'altro.

Tenendo conto di questi risultati, le analisi sono proseguite estendendosi anche a tipi cellulari facenti parte della nicchia midollare provenienti da pazienti malati di CLL, come monociti o Nurse-Like Cells (NLC), paragonate a monociti provenienti da pazienti sani e a linee cellulari di controllo esprimenti alti livelli di HGF. I risultati, oltre a confermare nuovamente la variabilità tra i campioni dei diversi pazienti, hanno rivelato che le cellule di soggetti malati di CLL esprimono un livello basale di HGF più elevato rispetto a quelle sane.

Infine sono stati analizzati tramite un saggio ELISA, insieme al siero proveniente da due pazienti di CLL, anche i terreni di coltura di tipi cellulari facenti parte della nicchia midollare. Questo in modo da valutare, oltre all'espressione genica di HGF, anche il suo effettivo rilascio in ambiente extracellulare. I tipi cellulari valutati sono: BMSC derivanti da soggetti sani o da soggetti affetti da CLL, Fibroblasti (HF), Condrociti articolari (HAC), MG63, Cellule endoteliali (HUVEC) e Cellule B di CLL.

Questa analisi ha confermato l'aumento del livello di HGF rilasciato dalle cellule provenienti da pazienti di CLL. Ha inoltre evidenziato che, come le MG63, con cui condividono l'origine stromale, anche le BMSC producono elevate quantità di HGF, sia in caso di provenienza da soggetti sani, che da soggetti affetti da CLL.

In aggiunta le cellule di CLL esprimono ovviamente anche il recettore di HGF c-Met. L'asse HGF/c-MET aumenta la sopravvivenza delle cellule leucemiche attraverso fosforilazione di STAT3, che può essere bloccata da un inibitore di c-Met stesso. La riduzione della produzione di HGF secreto da parte delle cellule di origine mesenchimale, ottenuta sperimentalmente mediante siRNA specifici, causa un aumento in vitro dell'apoptosi delle cellule di CLL, confermando il ruolo di questa

citochina nel mantenimento della vitalità del clone leucemico e suggerendone la sua importanza anche in vivo.

In seguito è stato anche dimostrato che le cellule di CLL inducono nei monociti l'acquisizione del fenotipo M2, in grado di contrastare la risposta anti-tumorale dell'organismo con la sua attività anti-infiammatoria [Pollard JW et al. 2009]. Questo è possibile a causa dell'aumento di HGF autocrino risultante dal cross-talk tra monociti/NLC e cellule di CLL, il quale induce un'alta secrezione di TGF $\beta$ , IL-10 e IDO (Indoleamina 2,3-diossigenasi), fattori responsabili del differenziamento dei monociti verso macrofagi M2 [Giannoni P et al. 2014].

HGF sembra ricoprire quindi un doppio ruolo nel favorire la CLL: da una parte favorisce la sopravvivenza del clone leucemico tramite il legame con il recettore c-Met e la fosforilazione di STAT3, mentre dall'altra contribuisce indirettamente sopprimendo la risposta anti-tumorale tramite l'induzione al differenziamento dei monociti in macrofagi M2.

## ***Obiettivo dello studio***

Questo studio si è dunque posto l'obiettivo di proseguire nell'indagine dell'influenza reciproca tra cellule di CLL e microambiente midollare. In particolare si è voluto proseguire da una parte gli esperimenti volti a verificare l'aumento dell'attività osteoclastogenica e la diminuzione di quella osteoblastogenica e i meccanismi alla base di questi cambiamenti, dall'altra quelli per approfondire l'influenza delle cellule del microambiente sulle cellule leucemiche e il ruolo di HGF nel favorire la sopravvivenza di quest'ultime, in particolar modo quali TF ne attivano la trascrizione e le eventuali differenze dei TF responsabili della sua regolazione nelle cellule della nicchia midollare.

Verranno innanzi tutto utilizzate delle BMSC indotte al differenziamento verso osteoblasti, successivamente coltivate in diverse condizioni volte a simulare la possibile influenza delle cellule di CLL in vivo. Tramite l'analisi di espressione di alcuni marker di osteogenesi sarà possibile valutare se i cloni leucemici hanno effettivamente interferito con le BMSC osteoindotte. Lo stesso approccio metodologico sarà utilizzato anche per indagare i rapporti esistenti tra CLL ed

osteoclastogenesi: appurato, grazie agli esperimenti già descritti, l'aumento del numero di monociti che differenzia in osteoclasti in presenza di mezzo condizionato di cellule di CLL, verrà effettuata un'analisi dell'espressione di alcuni geni marker del differenziamento e della fusione degli osteoclasti.

Per quanto riguarda invece lo studio dell'Hepatocyte Growth Factor, il progetto si pone come obiettivo iniziale la messa a punto di un sistema di identificazione dei TF che ne attivano la trascrizione. Per fare questo verranno utilizzate linee cellulari, di facile gestione e già note per avere diversi livelli di espressione di HGF (grazie ad esperimenti precedenti): MG63, HOS e SAOS-2

Queste sono tutte e tre linee cellulari di osteosarcoma, ma, mentre HOS e SAOS-2 presentano un livello di produzione di HGF molto basso, nelle MG63 tale livello è molto elevato, paragonabile a quello riscontrato in fibroblasti e osteoblasti.

L'approccio scelto è quello dell'utilizzo dell'Immunoprecipitazione della Cromatina (ChIP). Questa tecnica permette l'identificazione dei TF legati ai siti promotori del gene di interesse tramite l'utilizzo di anticorpi specifici diretti contro i TF stessi.

Una volta scelti i TF di interesse per iniziare lo studio e verificata la loro effettiva attività regolatoria nei confronti di HGF, sarà necessario provare a modularne la regolazione in modo da agire indirettamente sulla produzione del fattore.

Scopo ultimo dello studio sarà quello di valutare la possibilità di utilizzare i TF come possibili bersagli di terapie, cercando di inibire il rilascio di HGF tramite il blocco della sua trascrizione, in modo da diminuire la sua capacità di favorire la sopravvivenza della cellula leucemica.

# ***MATERIALI E METODI***

## **COLTURE CELLULARI**

Le cellule utilizzate per gli studi sono: primarie di cellule stromali staminali umane da midollo osseo (human Bone Marrow Stromal Cells; hBMSC; Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD 21793, USA); monociti e cellule B di individui sani e di pazienti malati di CLL (forniti dall'Unità Complessa di Patologia Molecolare dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova) e le linee cellulari di osteosarcoma umano MG-63 (Heremans et al. 1978), HOS (McAllister et al. 1971) e SAOS-2 (Rodan et al. 1987).

Come mezzi di coltura cellulare sono stati usati il terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), per le cellule B e i monociti, ed il terreno F12 per le linee cellulari MG-63, HOS, SAOS-2 e per le hBMSC, entrambi supplementati con 10% siero fetale bovino (FBS) e 2 mM L-Glutammina; i terreni così arricchiti sono d'ora in poi definiti "completi". Le hBMSC sono state inizialmente espanse per circa tre settimane in terreno completo, aggiungendo in questa fase anche il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF-2, 10 ng/mL); una volta raggiunto un numero adeguato di cellule queste sono state lavate con soluzione salina sterile (Phosphate Buffered Saline; PBS), staccate mediante tripsinizzazione, secondo protocolli standard, e ripiastrate in modo da raggiungere una condizione di semi-confluenza, ottimale per l'induzione osteogenica. Per indurre il differenziamento osteogenico il terreno è stato addizionato con Acido Ascorbico 200  $\mu$ M,  $\beta$ -Glicerofosfato 10 mM e Desametasone  $10^{-8}$  M. I monociti indotti ad osteoclastogenesi sono stati invece stimolati mediante addizione al terreno di coltura di 25 ng/mL di fattore di stimolazione per le colonie macrofagiche (Macrophage-colony Stimulating Factor, MCSF) e di 40 ng/mL di RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B).

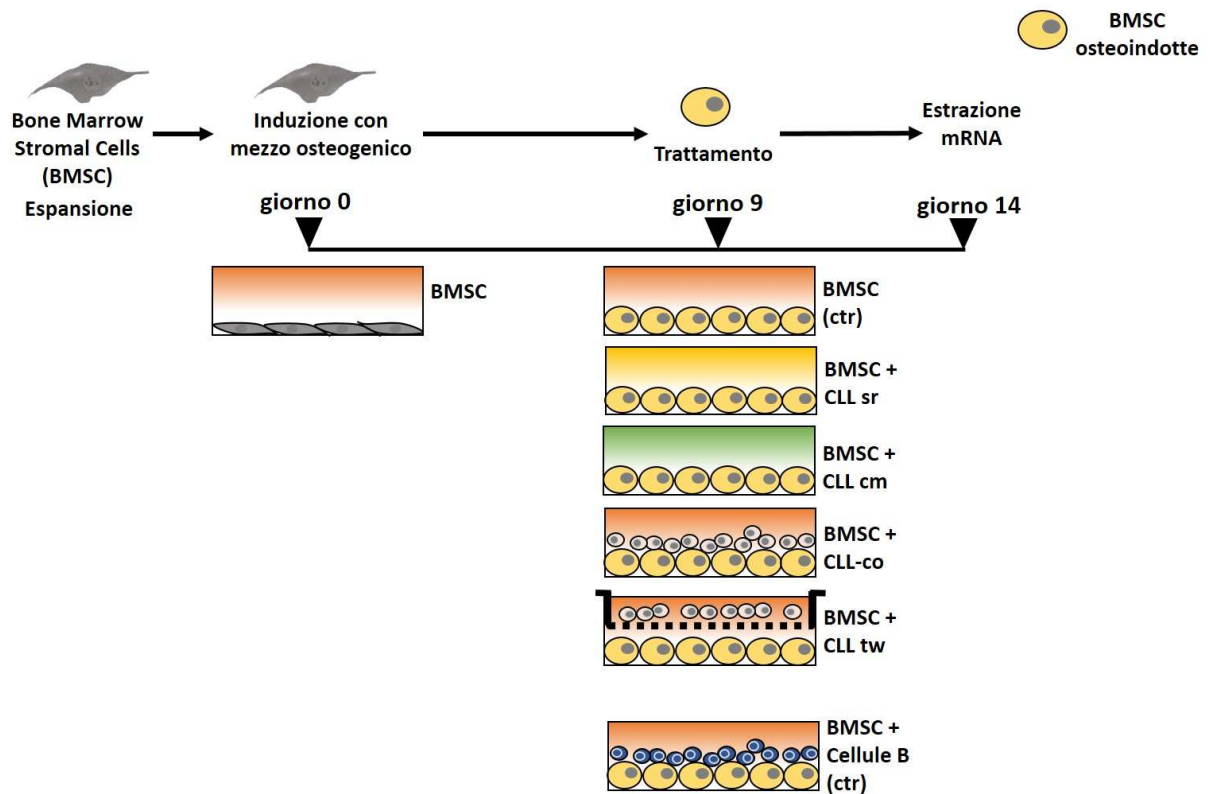
Quando e se necessario, aliquote di cellule delle varie colture sono state congelate in terreno completo addizionato con 10% Dimetil-solfossido (DMSO) e mantenute a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

# **OSTEOINDUZIONE E TRATTAMENTO**

## **DELLE hBMSC**

Per approfondire l'influenza delle cellule B di CLL sul differenziamento osteogenico delle hBMSC sono stati condotti esperimenti in cui le cellule stromali mesenchimali, osteoindotte come sopra descritto, sono state contemporaneamente: I) esposte a siero di pazienti di CLL (CLL-sr); II) esposte a terreno condizionato proveniente da colture di cellule B di CLL (CLL-cm); III) mantenute in co-coltura in transwell con cellule B di CLL (CLL-tw); IV) mantenute in co-coltura con cellule B di CLL (CLL-co); i sopraindicati setting sperimentali hanno quindi consentito di esaminare gli effetti dell'esposizione in condizioni in cui è possibile lo scambio di segnali cellulari nel microambiente ma senza contatto tra i due tipi cellulari (condizioni I, II e III) o in cui il contatto cellula-cellula sia possibile (condizione IV).

La procedura, schematizzata nella fig. 4, prevede l'espansione in vitro delle hBMSC, con una semina iniziale di 30'000 cellule in multiwell da 24 pozzetti lasciate proliferare fino a semi-confluenza, e la loro induzione in terreno osteogenico come descritto in precedenza, applicata senza modifiche per le colture di controllo. Le cellule destinate ai diversi trattamenti sperimentali, invece, sono state esposte alle condizioni I-IV a partire dal 9' giorno di osteoinduzione, fino a termine trattamento. Nelle condizioni I e II, 2/5 del mezzo di coltura sono stati sostituiti con altrettanto siero o mezzo condizionato; nelle condizioni III e IV sono invece state seminate  $10^6$  cellule B per ogni pozzetto nelle condizioni di co-coltura a contatto o in transwell. Come ulteriore controllo sono anche state aggiunte hBMSC coltivate in co-coltura con cellule B sane. Dopo 5 giorni, ovvero al 14' giorno dall'inizio dell'osteoinduzione, le hBMSC di ogni condizione sono state lavate in PBS, staccate mediante tripsinizzazione, centrifugate ed utilizzate per estrarre i corrispondenti campioni di mRNA, per le successive analisi di espressione genica.



**Figura 4:** procedura sperimentale per l'analisi dell'influenza delle cellule B di CLL sulle BMSC.

## **ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA**

I livelli dei trascritti per specifici mRNA di interesse sono stati valutati mediante RT-PCR quantitativa. Si è estratto l'mRNA totale dai campioni a disposizione, da cui si sono ricavati i corrispondenti pools di cDNA che sono poi serviti per la valutazione quantitativa tramite Real Time RT-PCR, come di seguito dettagliato.

### **1. ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE**

L'estrazione dell'RNA totale è stata effettuata utilizzando due diversi kit disponibili commercialmente.

### **1.a ESTRAZIONE TRAMITE L'UTILIZZO DEL KIT PerfectPure™ RNA Cell & Tissue (5PRIME™)**

La procedura prevista per l'impiego di questo kit prevede la lisi delle sospensioni cellulari in esame con una soluzione contenente  $\beta$ -mercaptoetanololo, l'eliminazione del DNA tramite un trattamento con DNasi e l'isolamento dell'RNA mediante centrifugazione su colonna di ritenzione. Una serie di lavaggi ed una fase di eluizione delle colonne mediante acqua DNasi/RNasi-Free consente di recuperare i campioni di acido nucleico purificato.

### **1.b ESTRAZIONE TRAMITE L'UTILIZZO DEL KIT GenUP™ Total RNA (biotechrabbit™)**

Il protocollo per questo secondo metodo di estrazione prevede la lisi del campione tramite una soluzione non contenente  $\beta$ -mercaptoetanololo e l'eliminazione del DNA genomico dal campione tramite separazione su colonna per microcentrifugazione. L'eluato così ottenuto viene poi passato su una seconda colonna per affinità da cui, dopo ripetuti passaggi di lavaggio mediante etanolo 70% e tamponi, l'RNA viene infine eluito con acqua DNasi/RNasi-Free.

Per entrambe le procedure è stata utilizzata la centrifuga Eppendorf 5415R e la determinazione della purezza e la quantificazione della concentrazione dei campioni di RNA estratto sono state valutate spettrofotometricamente mediante analisi dei rapporti di assorbanza a 260/280 nm in uno spettrofotometro BECKMAN COULTER DU730.

## **2. RETROTRASCRIZIONE A cDNA**

I pools di cDNA sono stati preparati a partire da quantità equivalenti di mRNA totali, preparati come sopra descritto, utilizzando il kit SuperScript™ III First-StrandSynthesis System for RT-PCR (Invitrogen™), secondo le procedure fornite dal venditore, in un termociclatore Eppendorf MASTERCYCLER epgradient S.

L'utilizzo del kit prevede la preparazione di una soluzione contenente 5  $\mu$ g di RNA totale per ciascun campione e/o trattamento. Questi vengono denaturati a



65°C per 5', in presenza di 1 µL di 50 µM oligo(dT)<sub>20</sub> e 1 µL di 10 mM dNTPs mix, in un volume minimo di 10 µL. I campioni vengono poi trasferiti per almeno 1' in ghiaccio ed addizionati di 2 µL di 0,1 M Ditioneitololo (DTT), 1 µL di RNaseOUT™, 1 µL dell'enzima SuperScript™ III RT, e volumi opportuni di Buffer di reazione e di 50 mM MgCl<sub>2</sub>, entrambi in quantità corrispondenti al 10% del volume finale. I campioni così preparati vengono poi sottoposti ai seguenti cicli di temperatura: 10' a 25°C (annealing), 50' a 50 °C (sintesi del cDNA) e 5' a 85°C (per porre termine alla reazione). La degradazione dell'RNA presente viene effettuata addizionando a ciascun campione 1 µL di RNase H e lasciando reagire l'enzima per 20' a 37°C. Il cDNA così ottenuto può essere conservato a -20°C.

### 3. REAL TIME PCR

L'espressione relativa di ciascun gene di interesse è stata valutata mediante RT-PCR quantitativa utilizzando come fluoroforo la molecola Sybr-Green.

I cDNA sono stati amplificati utilizzando la miscela FastStart SYBR Green Masterix (Roche) in un apparato Eppendorf Realplex<sup>2</sup>, effettuando reazioni in triplicato per ogni gene/condizione di trattamento e normalizzando i dati alla contemporanea espressione, nello stesso campione, di un gene housekeeping come la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) o la RNA polimerasi II. Le condizioni di reazione, per ciascun gene di interesse sono riportate qui di seguito:

2' a 95°C  
30" a 94°C  
30" a 58°C  
40" a 72°C  
7' a 72°C

} x55 vv

La specificità di reazione è stata verificata mediante valutazione dell'unicità dei prodotti della curva di melting.

I primer per ciascun gene di interesse sono stati derivati o da sequenze precedentemente pubblicate o sono stati appositamente disegnati allo scopo.

GAPDH*	Fw: 5'- ACCCACTCCTCCACCTTTgA Rev: 5'- CTgTTgCTgTAgCCAAATTCgT
RNApol-II	Fw: 5'- gACAATgCAgAgAAgCTgg Rev: 5'- gCAggAAgACATCATCATCC
RUNX2*	Fw: 5'- CTTCAATTCgCCTCAGAAACA Rev: 5'- TTgATgCCATagTCCCTCCT
DKK1	Fw: 5'- CgggAATTACTgCAAAAATggA Rev: 5'- gCACAgTCTgATgACCggAgA
Osteocalcina*	Fw: 5'- CgCCgCCggCAgCTACCA Rev: 5'- TCAgAgATTTCTCCCGgATA
Osteopontina*	Fw: 5'- TggCTAAACCCTgACCCATCT Rev: 5'- gCTTTCgTTggACTTACTTggAA
SOST	Fw: 5'- gTggCAggCgTTCAAgAATg Rev: 5'- ggACACgTCTTTggTCTCAA
Catepsina K	Fw: 5'- TCCTTCCAgtTTTACAgCAAgt Rev: 5'- gTTTCCCAgtTTTCTCCCC
MMP9	Fw: 5'- TCgAACTTTgACAgCgACAAgt Rev: 5'- ACTgAggAATgATCTAAgtCCC
NFATc-1	Fw: 5'- TgCAACgggAAgtAgAAgtCg Rev: 5'- gTCTTgggAgAggACTTAACC

**Tabella 1:** primer utilizzati per le reazioni di Real Time RT-PCR. Le coppie di primer relative ai geni target indicati con \* sono derivate da lavori precedentemente pubblicati [Giannoni P et al. 2016]; le rimanenti coppie sono invece state appositamente disegnate per le attività descritte.

# **ANALISI DEI FATTORI TRASCRIZIONALI**

## **COINVOLTI NEL CONTROLLO**

### **DELL'ESPRESSIONE DI HGF**

#### **IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA**

L'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) è stata impiegata per identificare la presenza di fattori trascrizionali (TF) legati a specifici siti responsivi sul DNA. Nel nostro caso è stata utilizzata per verificare l'eventuale presenza di TF sul promotore di HGF in preparati provenienti da diverse linee cellulari.

Per poter individuare il promotore di HGF è stato utilizzato un approccio bioinformatico. Una volta ottenuta la sequenza del gene HGF (CCDS 5597.1), è stata presa in considerazione la porzione di nucleotidi che precede il codone noto di inizio trascrizione; la sequenza del promotore di HGF (pHGF), qui considerato come il tratto di DNA compreso tra il nt -1982 al nt +63 a monte della sequenza depositata NCBI NM\_000601.4, corrispondente al trascritto per HGF sul cromosoma 7 umano (NC\_000007.14), è stata esaminata con un software adeguato (TRANSFAC-BIOBASE/Tfsitescan; liberamente accessibile on-line dal sito [http://molbiol-tools.ca/Transcriptional\\_factors.htm](http://molbiol-tools.ca/Transcriptional_factors.htm)) atto ad identificare gli elementi responsivi (ER) su di essa presenti putativamente in grado di legare i corrispondenti fattori trascrizionali. Questa analisi ha individuato le sequenze consensus riconosciute da numerosi fattori di trascrizione: quelle prese in considerazione per il proseguimento della parte sperimentale sono indicate in fig. 5.



**Figura 5:** posizioni delle sequenze responsive dei TF individuati sul promotore di HGF. E' indicato il codone di inizio trascrizione ATG, evidenziato in grassetto e sottolineato, mentre in rosso è indicato il reale nucleotide +1.

La determinazione di quali ER e, e conseguentemente anche di quali TF tenere in considerazione, è stata anche dettata dalla disponibilità in commercio di anticorpi diretti contro di essi e dal loro possibile coinvolgimento in pathway di interesse per lo studio intrapreso.

Sulla base della posizione delle sequenze degli elementi responsivi selezionati, dunque, sono quindi stati disegnati, per tutta la lunghezza del promotore, appositi primer, sia in posizione forward che reverse, in grado di generare ampliconi contenenti le ER di interesse e di dimensioni non superiori ai 500 nt. Gli ampliconi sono stati scelti in modo da avere lunghezza più o meno variabile tra loro, in modo da poter essere distinti nell'ambito di una corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Esclusi il primo e l'ultimo, tutti i primer sono stati disegnati in modo da poter essere utilizzati sia come Forward che come Reverse e in modo da avere tutti una temperatura di melting simile, compresa tra 62°C e 66°C. Sono state così ottenute una serie di coppie intercambiabili di primer, tali da poter coprire l'intera lunghezza della sequenza promotrice.

In particolare l'intera sequenza di pHGF è stata suddivisa in 9 zone, delimitate da coppie di primer Fw e Rev denominati in ordine crescente. Le coppie inizialmente individuate sono quelle visibili in figura 6:



**Figura 6:** posizioni delle coppie di primer inizialmente utilizzati e zone da essi individuate sul promotore di HGF.

Le coppie di primer così disegnate vanno ad individuare ampliconi aventi le seguenti dimensioni:

Zona 1	157 bp
Zona 2	267 bp
Zona 3	254 bp
Zona 4	295 bp
Zona 5	335 bp
Zona 6	242 bp
Zona 7	199 bp
Zona 8	241 bp
Zona 9	289 bp

In particolare le sequenze consensus da noi scelte per i successivi esperimenti venivano a trovarsi all'interno della zona 1 (sequenze per ER $\alpha$ ), della zona 3 (sequenza per C/EBP $\alpha$ ), della zona 4 (sequenza per Ikaros2) e della zona 8 (sequenza per PPAR $\gamma$ ).

La funzionalità delle coppie di primer è stata esaminata direttamente su campioni di DNA genomico mediante PCR e separazione elettroforetica degli ampliconi ottenuti, preparati come successivamente descritto. Tuttavia, dopo aver effettuato questo prima verifica, è risultato necessario disegnarne di nuovi per la zona 1 e la zona 8, visibili nella fig. 7.



**Figura 7:** Tutti i primer utilizzati e le sequenze consensus di interesse sul promotore di HGF.

## 1. PREPARAZIONE DELLA CROMATINA SOLUBILE

Le cellule in coltura sono state fissate utilizzando Paraformaldeide (PFA) 1% in PBS. La PFA a questa concentrazione permette la formazione di legami cross-link covalenti tra il DNA e le proteine con cui esso interagisce, legami però reversibili tramite trattamento termico. Le cellule così fissate sono state raccolte mediante uno scraper in apposito buffer (Collection Buffer: Tris HCl pH 9,4 100 mM; DTT 10 mM) e centrifugate a 400xg. I pellet cellulari così ottenuti sono stati sottoposti a due successivi lavaggi con due specifici buffer (Buffer L1: 0,25% Triton X-100, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES pH 6,5; Buffer L2: 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 6,5), con lo scopo di modificare gradualmente pH e salinità. Il pellet risultanti sono stati quindi risospesi in un tampone di lisi (Lysis buffer: 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM TRIS HCl pH 8,1, 1x protease inhibitor

cocktail) e lisati mediante sonicatura (6 cicli di sonicatura a massima ampiezza a 10 secondi/ciclo in ghiaccio mediante un apparato SonyPrep150 della Cellai). Esperimenti di messa a punto, effettuati preventivamente, hanno consentito infatti di verificare che tali condizioni e per tale strumento, la maggior parte del DNA genomico veniva ridotta a frammenti di dimensioni ridotte (<2000 nt). La cromatina solubile così ottenuta è stata poi diluita in apposito tampone (Dilution Buffer: 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM TRIS HCl pH 8,1, con aggiunta di un cocktail di inibitori delle proteasi).

## **2. VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA**

La concentrazione proteica dei lisati è stata valutata mediante un sistema di dosaggio disponibile commercialmente, il Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Inc.). Esso prevede la determinazione del contenuto in proteine di ciascun campione tramite la misura dell'assorbanza dei preparati a 564 nm confrontata con quelle di campioni standard a concentrazione nota di proteine.

## **3. IMMUNOPRECIPITAZIONE**

Campioni di cromatina solubile, equiparabili per contenuto proteico, sono stati quindi sottoposti all'immunoprecipitazione tramite l'aggiunta di anticorpi specifici diretti contro i TF di interesse. L'aggiunta al sistema di una resina specifica (nProtein A Sepharose™ 4 Fast Flow, GE Healthcare, UK) ha consentito poi di legare e far precipitare gli immunocomplessi.

La preparazione della resina prevede una pre-incubazione con una soluzione di sperma di salmone 10 mg/mL in tampone 10 mM Tris/HCl, pH 8.1, 1 mM EDTA e sonicato nelle stesse condizioni dei campioni, per saturare possibili siti di precipitazione aspecifici. La resina così preparata viene utilizzata per sottoporre i campioni ad una fase di immunoclearing, incubando la resina con del siero pre-immune (Normal Mouse Serum) per 2 ore a 4°C, consentendo la precipitazione e l'eliminazione di eventuali immunocomplessi aspecifici.

Ai templati così ottenuti sono stati aggiunti anticorpi diretti contro i fattori trascrizionali PPAR $\gamma$  (Ab E-8: sc-7273, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e Ikaros (Ab



E-2: sc-398265, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) in concentrazione finale 1 µg per ogni mL di template, lasciandoli in incubazione a 4° overnight in agitazione continua, per consentire la formazione degli immunocomplessi specifici anticorpo-fattore trascrizionale.

I campioni così processati sono stati quindi incubati con l'appropriata quantità di resina per 2 ore a 4°C in agitazione continua, per la separazione degli eventuali immunocomplessi formati. Una volta recuperati i campioni di resina mediante centrifugazione questi sono stati lavati sequenzialmente con appositi tamponi (TSE I: 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM TRIS HCl pH 8,1, 150 mM NaCl; TSE II: 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM TRIS HCl pH 8,1, 500 mM NaCl; TSE III: 0,25% LiCl, 1% NP-40, 1% Deossicolato, 1 mM EDTA, 10 mM TRIS HCl pH 8,1; TE Buffer: 10 mM TRIS HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) ed eluiti con Elution Buffer (1% SDS e 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>), per separare i complessi anticorpali dalla resina. I preparati così raccolti sono stati sottoposti alla reversione del legame cross-link tramite calore, mantenendo il campione a 65°C overnight, ed alla digestione delle componenti proteiche mediante incubazione con Proteinasi K (aggiunta in una quantità pari a 160 µg ogni 50 µL di eluato) per 2 ore a 50°C.

I diversi preparati di DNA così ottenuto sono stati passati in colonna di purificazione (Illustra™ MicroSpin S-400, GE Healthcare, UK), in modo da eliminare i frammenti di dimensioni eccessive rispetto a quelle di interesse. Sui preparati purificati è stato poi determinato il contenuto in DNA mediante analisi spettrofotometrica, come precedentemente descritto.

#### **4. AMPLIFICAZIONE TRAMITE PCR ED ELETTROFORESI DEI PRODOTTI DI REAZIONE**

Per l'amplificazione dei frammenti di DNA di interesse sono state effettuate PCR, con il kit Platinum® PCRSupermix, Invitrogen, partendo da quantità iniziali pari a 0,5-1,5 µg di DNA per preparato. Le diverse coppie di primer utilizzate sono state opportunamente impiegate per amplificare, se esistente, la regione in cui è presente la specifica sequenza responsiva su cui era putativamente legato il corrispondente TF, quando immunoprecipitato.

I primer utilizzati, appositamente disegnati per poter essere impiegati ad una Tm di 56-58°C, sono i seguenti:

HGF1a Fw: 5'- gggTTCTggTTTCTAggAgCC	zona 1
HGF1 Fw: 5'- TTTCTATgCCTCgCCTTggg	
HGF1 Rev: 5'- ACCCTgAATTgCTCCACTgC	
HGF2 Fw: 5'- gCAgTggAgCAATTCaggT	zona 2
HGF2 Rev: 5'- ACAACCTgCCTgATAAgTCCC	
HGF3 Fw: 5'- gggACTTATCAggCAggTTg	zona 3
HGF3 Rev: 5'- TggATgCTgAgggATACTTgC	
HGF4 Fw: 5'- gCAAgTATCCCTCAgCATCCA	zona 4
HGF4 Rev: 5'- ACCggAAATCCCTCAAgCTg	
HGF5 Fw: 5'- CAgCTTgAgggATTTCCggT	zona 5
HGF5 Rev: 5'- AAgCACgCAgATTgTCAgATg	
HGF6 Fw: 5'- CATCTgACAATCTgCgTgCTT	zona 6
HGF6 Rev: 5'- TCTTTCAgCCAAATgTgCCC	
HGF7 Fw: 5'- gggCACATTTggCTgAAAgA	zona 7
HGF7 Rev: 5'- CCAgATCCCAgTggCTCCTA	
HGF8 LB Fw: 5'- gCCTgTgCCTTgATTTAgCC	zona 8
HGF8 LB Rev: 5'- TTCCAgCCCCCTCCTTTCTC	
HGF8 V Fw: 5'- CCTTgCTCCTCCCTTCCTTAC	
HGF8a Rev: 5'- CAACAgCACCAAACAgATCCC	
HGF8 FU Rev: 5'- CCCTTCAACAgCACCAAACAg	
HGF8 Red Fw: 5'- TATgCTgCTTCCCCTTCCTC	
HGF8 N Rev: 5'- TTAACAACAgCCCTTTACTCTC	
HGF9 LB Fw: 5'- gAggAAAggAgggggCTggAA	zona 9
HGF9 LB Rev: 5'- AggAggAgATgCAggAggAC	
HGF9 FU Fw: 5'- CTgTTTggTgCTgTTgAAggg	
HGF9 FU Rev: 5'- CTggCAggAgTTTggTCACC	

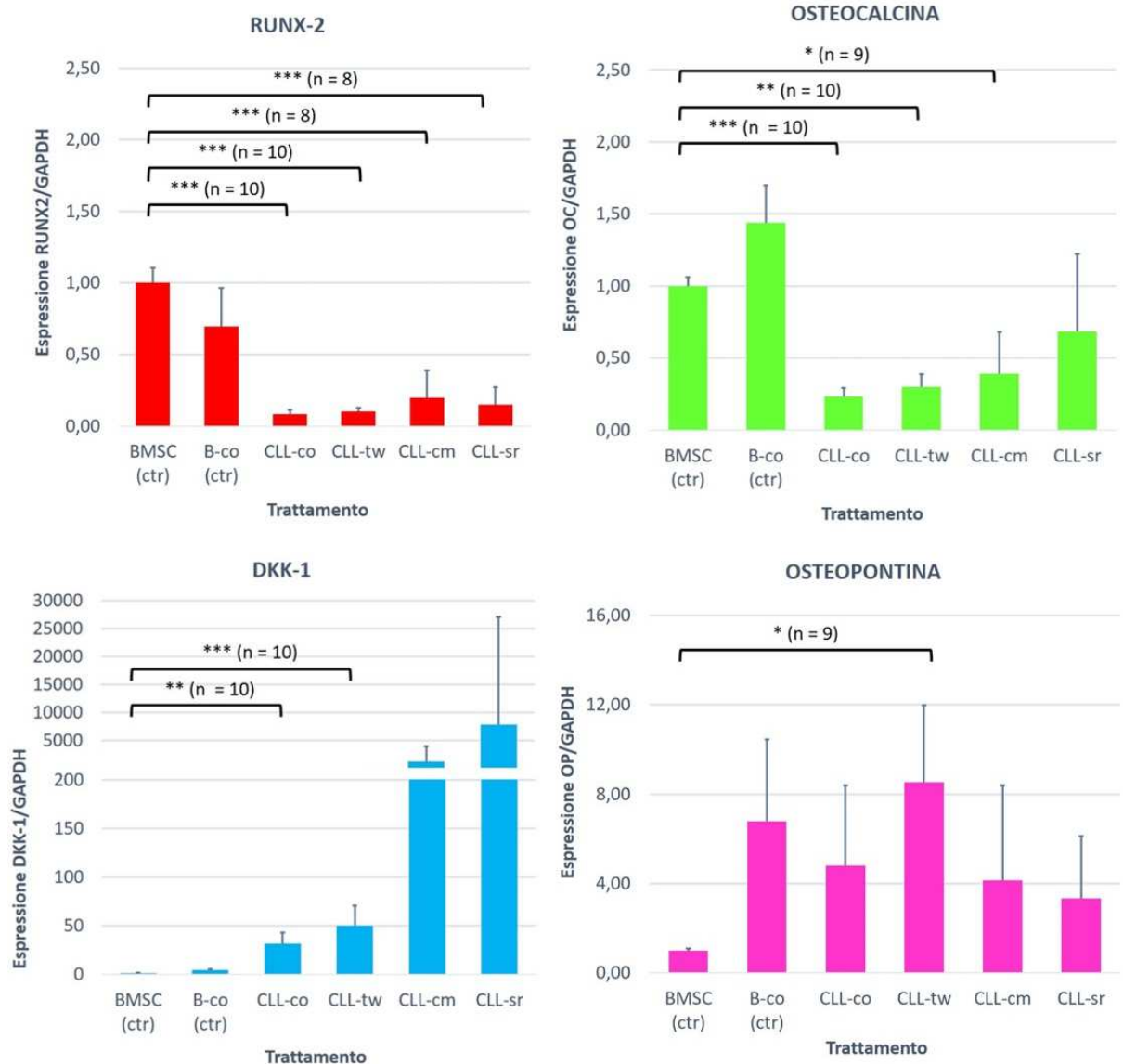
**Tabella 2:** primer utilizzati per le reazioni di PCR qualitativa nell'ambito della CHIP.

Le reazioni sono state condotte con un primo step di denaturazione (2' a 95°C), 55 cicli comprendenti 1' a 94°C, 1' a 58°C ed 1' a 72°C, seguiti da un ultimo step di 1' a 72°C per completare la reazione. Gli ampliconi così ottenuti sono stati poi visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1.5% in tampone TBE (90 mM Tris base pH 7,6, 90 mM acido borico, 2 mM EDTA) e fotografati in luce UV.

# ***RISULTATI***

## **1. Inibizione dell'espressione dei marker di differenziamento osteogenico nelle hBMSC a seguito di esposizione a cellule, a siero o a terreno condizionato derivato da cellule B di CLL**

Il possibile effetto delle cellule B di CLL sulle hBMSC osteoindotte è stato studiato ricavando campioni di mRNA dalle cellule stromali umane coltivate in diverse condizioni: con aggiunta al mezzo di coltura di siero proveniente da pazienti di CLL (CLL-sr), con aggiunta di mezzo condizionato di cellule B di CLL (CLL-cm), in co-coltura in transwell con cellule B di CLL (CLL-tw), o infine in co-coltura a contatto con cellule B di CLL (CLL-co). Negli mRNA derivati dall'estrazione delle hBMSC sono stati valutati tramite Real Time PCR i livelli di espressione dei seguenti marker di osteogenesi: RUNX2, responsabile dell'induzione delle BMSC in osteoblasti immaturi e considerato il gene master del pathway di osteoblastogenesi [Bruderer M et al. 2014; Ge C et al. 2007]; Dkkopf (DKK-1), che regola negativamente la formazione dell'osso agendo come antagonista di Wnt [Ke HZ et al. 2012]; Osteocalcina (OC), che ha effetto pro-osteoblastico e porta ad un aumento della densità ossea, è un marker di formazione dell'osso [Boskey A et al. 1998; Poundarik A et al. 2012]; Osteopontina (OP), componente della matrice ossea, marker di osteogenesi tardiva [Turner PJ et al. 2010]. Come controllo sono state usate hBMSC coltivate da sole in normale mezzo di coltura osteogenico e hBMSC osteoindotte coltivate con cellule B derivate da soggetti sani (fig. 8).



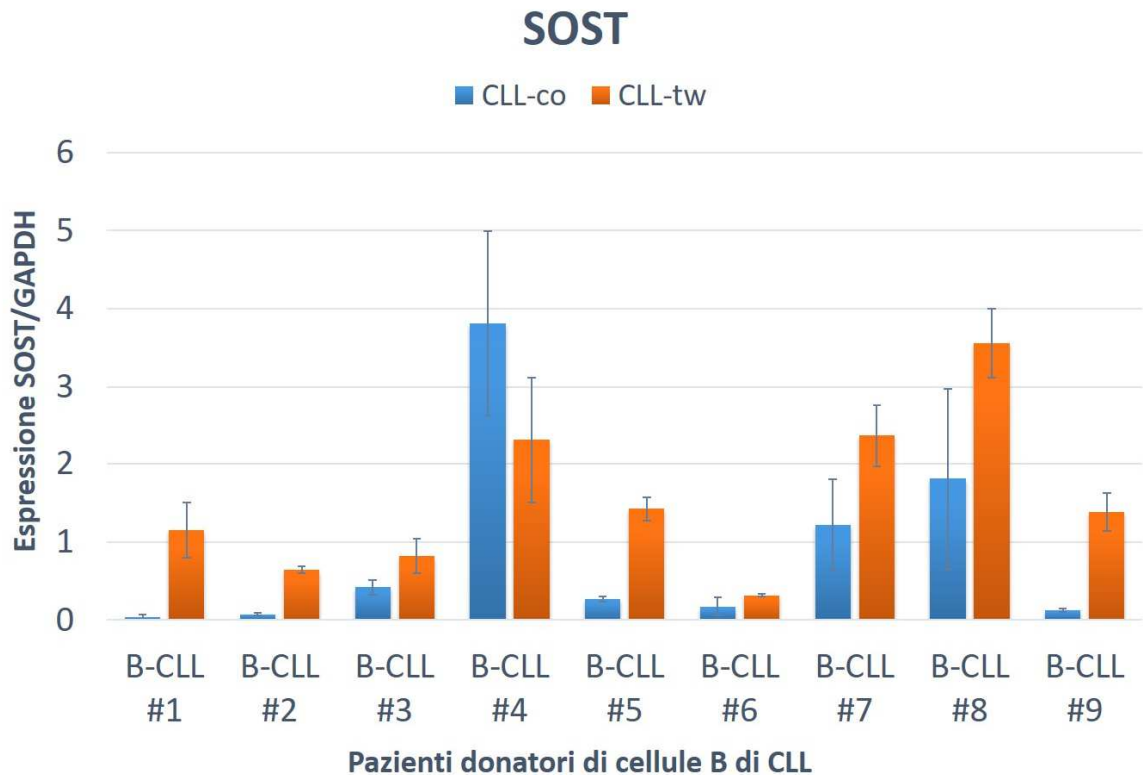
**Figura 8:** Livelli di espressione dei messaggeri per i marker osteogenici considerati. Ogni istogramma rappresenta il valore medio di trascritto normalizzato contemporaneamente sia rispetto all'espressione del gene housekeeping che alla condizione di controllo (BMSC-ctr), e relativo al numero di casi indicati (n); le barre di errore rappresentano le deviazioni standard (SD). Per le valutazioni di significatività: \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ ; \*:  $0.01 < p < 0.05$

L'analisi dell'espressione di questi marker evidenzia un'inibizione complessiva dell'osteoblastogenesi. Come mostrato infatti in fig. 8 RUNX2 risulta avere un'espressione fortemente diminuita, in maniera statisticamente significativa, in tutte e quattro le condizioni sperimentali (CLL-sr, CLL-cm, CLL-co, CLL-tw), mentre non sembra subire conseguenze dalla co-coltura con cellule B provenienti da soggetti sani. Analogamente, anche l'Osteocalcina subisce una forte down-

regolazione in presenza di cellule B di CLL, in co-coltura o transwell, di mezzo condizionato o di siero, mentre risulta avere un'espressione normale nel controllo in co-coltura con cellule B sane. DKK-1 è un marker negativo dell'osteogenesi e come tale viene espresso a bassi livelli in entrambe le condizioni di controllo. Al contrario, nelle condizioni sperimentali CLL-co e CLL-tw risulta significativamente up-regolato. Nei casi di CLL-cm e CLL-sr, l'aumento dell'espressione è invece talmente marcato che risulta impossibile calcolarne la significatività statistica. Anche l'Osteopontina risulta infine avere un'aumentata espressione nelle condizioni sperimentali. In questo caso però l'aumento sembra essere indotto anche dalla co-coltura con le cellule B sane.

I risultati complessivamente sembrano quindi suggerire una correlazione tra la presenza delle cellule B di CLL (indipendentemente dal loro contatto con le hBMSC) e/o i fattori da esse secreti e la diminuzione del differenziamento osteogenico nelle cellule stromali, misurata in termini di espressione di marcatori specifici.

Per completare il quadro dei marker, si è in seguito scelto di effettuare anche l'analisi dell'espressione del gene SOST, altro marker negativo di osteogenesi: il suo prodotto, la proteina Sclerostina, è infatti una glicoproteina secreta dagli osteociti maturi, inibitrice del pathway di Wnt e quindi della formazione dell'osso [Poole KE et al. 2005].



**Figura 9:** Livelli di espressione di SOST nelle co-culture e colture in transwell di BMSC osteoindotte con cellule B di CLL. Gli istogrammi rappresentano il livello di trascritto per la proteina in oggetto nei diversi campioni/condizioni normalizzato rispetto all'espressione del gene housekeeping (GAPDH). Le barre di errore rappresentano le SD delle determinazioni effettuate in triplicato su ogni campione. Per le valutazioni di significatività: \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ ; \*:  $0.01 < p < 0.05$ .

Questi risultati sono ancora in fase di completamento. L'analisi è infatti stata effettuata solo su hBMSC osteoindotte coltivate in condizioni di co-cultura e coltura in transwell con cellule B di CLL. Manca inoltre un set di campioni di hBMSC di controllo, con i quali andranno poi confrontati i risultati.

## **2. L'esposizione di monociti al mezzo condizionato di coltura di cellule B di CLL stimola l'osteoclastogenesi**

In seguito è stata oggetto di indagine la possibile influenza attuata dalle cellule B di CLL (tramite mezzo condizionato, cm) sul differenziamento dei monociti in osteoclasti, quale possibile concausa dell'alterazione della struttura ossea trabecolare nei soggetti malati di CLL.

Da esperimenti precedenti era stato evidenziato come l'aggiunta di CLL-cm a colture di monociti indotti al differenziamento in osteoclasti (tramite l'aggiunta di MCSF e RANKL, entrambi a 25 ng/mL, secondo un comune protocollo differenziativo) fosse in grado di portare ad un aumento del numero di precursori degli osteoclasti; in breve  $1 \times 10^5$  monociti CD14+, purificati mediante separazione su colonna, venivano piastrati in ciascun pozzetto di coltura in terreno completo ed in esso mantenuti per le successive 24 ore. Le cellule venivano poi sottoposti alla stimolazione con i fattori sopraindicati, ed il terreno, addizionato con MCSF e RANKL, sostituito ogni 3 giorni per la settimana successiva. Queste cellule si differenziavano in elementi plurinucleati (la condizione minima per considerare una cellula come in fase di differenziamento era la contemporanea presenza di almeno tre nuclei), marcatamente positivi per la fosfatasi alcalina tartrato-resistente (TRAP+) e di notevoli dimensioni, derivando dalla fusione di più cellule. L'esperimento era stato condotto utilizzando sia monociti provenienti da individui sani che monociti provenienti dagli stessi pazienti malati di CLL da cui erano fornite le cellule B utilizzate, ottenendo risultati analoghi. Era stata inoltre verificata l'importanza fondamentale della presenza di RANKL: l'aggiunta di CLL-cm (contenente solo bassi livelli di RANKL) alle cellule indotte ad osteoclastogenesi con il solo MCSF, infatti, non era stata sufficiente a compensare il fattore mancante ed a portare le cellule al differenziamento completo in osteoclasti. Era però risultato evidente l'effetto sinergico che il mezzo condizionato era in grado di esercitare nell'induzione all'osteoclastogenesi nel momento in cui RANKL era aggiunto insieme a MCSF.

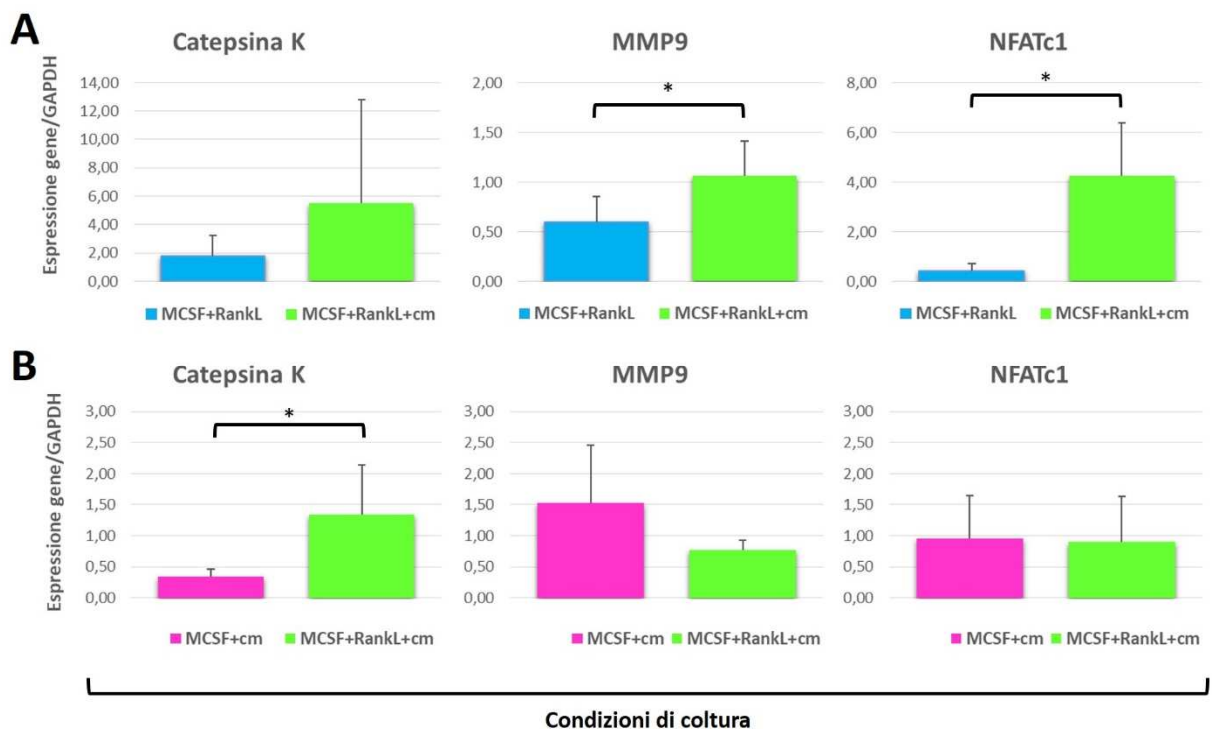
Per approfondire l'influenza del mezzo condizionato sul differenziamento dei monociti in osteoclasti, sono state nuovamente effettuate delle colture di monociti con aggiunta di MCSF, RANKL e CLL-cm. In particolare è stata valutata



l'espressione di alcuni geni di interesse coinvolti nei fenomeni di fusione cellulare che intercorrono tra i precursori degli osteoclasti: MMP9, metallo-proteasi coinvolta principalmente nella degradazione della matrice ossea da parte degli osteoclasti, ma anche nel loro reclutamento e differenziamento [Batista K et al. 2014; Ortega N et al. 2003]; Catepsina K, proteasi coinvolta nel riassorbimento osseo [Falguevret JP et al. 2001; Lark MW et al. 2002; Inui T et al. 1997]; NFATc1, regolatore di geni importanti per il differenziamento e la fusione degli osteoclasti [Kim JH et al. 2014; Kim JH et al. 2016; Takayanagi H et al. 2002]; DC-STAMP, recettore di membrana, principale regolatore della fusione degli osteoclasti [Courtial N et al. 2012; Islam R et al. 2014; Zhang C et al. 2014].

I primer utilizzati per DC-STAMP hanno dato risultati non attendibili. L'analisi di questo gene andrà pertanto ripetuta con primer nuovi.

L'analisi degli altri geni invece ha portato i seguenti risultati:



**Figura 10:** Livelli di espressione dei trascritti per i geni di interesse in monociti coltivati in presenza di MCSF, RANKL e mezzo condizionato di cellule B di CLL (MCSF+RANKL+cm) a confronto con MCSF+RANKL (A) o con MCSF+CLL-cm (B). Gli istogrammi rappresentano il valore medio del livello di espressione del trascritto considerato normalizzato rispetto all'espressione del gene housekeeping (GAPDH), esaminato su tre casi differenti. Le barre di errore indicano le SD. Per le valutazioni di significatività: \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ ; \*:  $0.01 < p < 0.05$ .

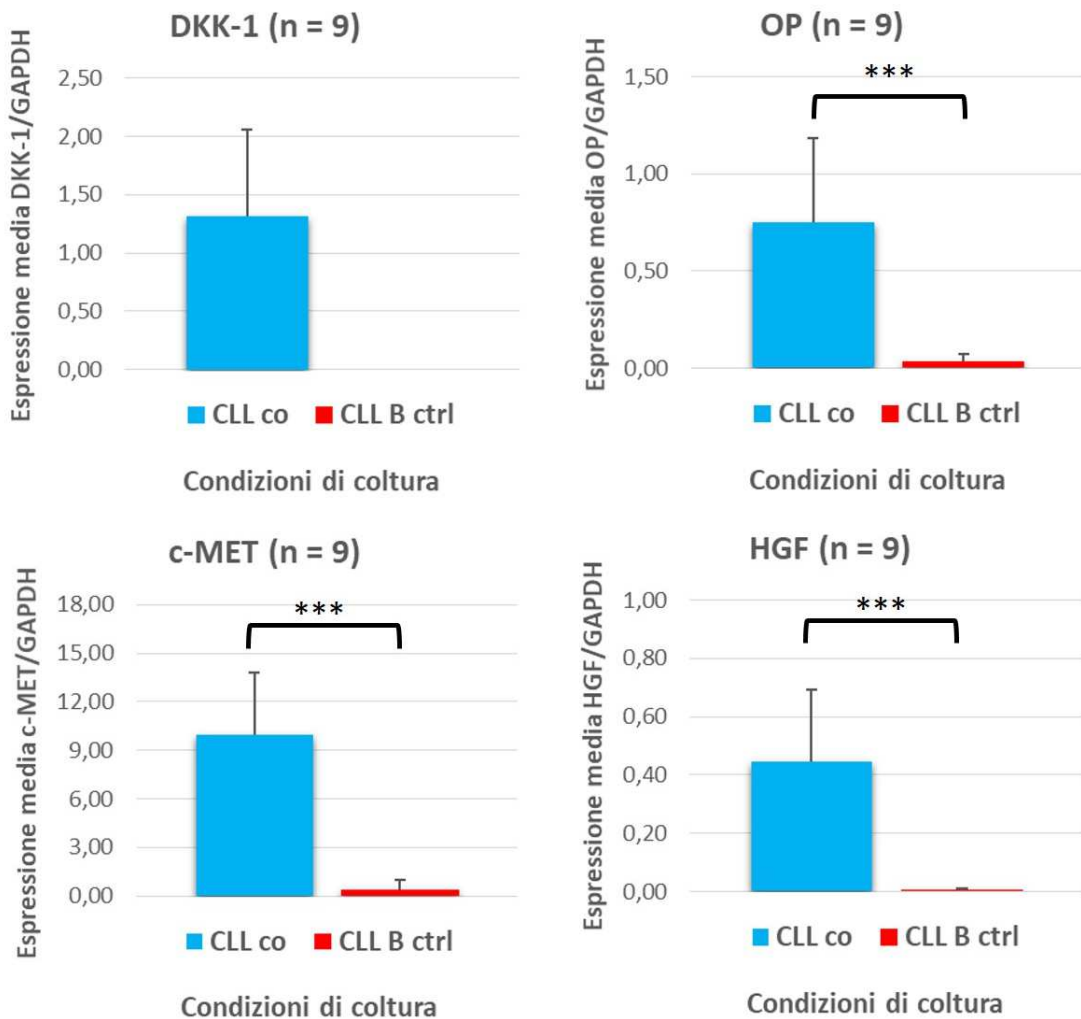
I risultati mostrano come, in seguito all'aggiunta del mezzo condizionato, si abbia un aumento dell'espressione di tutti e tre i geni nei monociti trattati con aggiunta di CLL-cm a confronto con quelli trattati con i soli MCSF e RANKL, aumento statisticamente significativo nel caso di MMP9 e NFATc1 (fig. 10A). Inoltre, tramite un confronto con monociti coltivati con CLL-cm e il solo MCSF, si è evidenziato come l'aggiunta di RANKL sia in grado di portare ad un aumento statisticamente significativo dell'espressione del gene Catepsina K (fig. 10B), in accordo con i dati descritti in precedenza.

I risultati suggeriscono quindi che esista una correlazione tra i fattori secreti dalle cellule B di CLL e l'aumento del numero di osteoclasti, con un possibile conseguente effetto su riassorbimento osseo.

### **3. Influenza delle hBMSC sulle cellule B di CLL**

Per indagare la possibile influenza delle cellule della nicchia midollare sulle cellule B di CLL, è stata in seguito effettuata un'analisi dell'espressione di alcuni geni nelle cellule B provenienti da pazienti malati di CLL coltivate in co-cultura con hBMSC, utilizzando come controllo le stesse cellule B coltivate da sole. I geni indagati sono stati: DKK-1, la cui espressione è spesso alterata nei tumori [Lee AY et al. 2004; Kaiser M et al. 2008; Qiang YW et al. 2008]; Osteopontina, prodotta in piccola parte dalle cellule B e, secondo letteratura, in quantità maggiore nelle leucemie, e in generale nei tumori [Rothstein TL et al. 2009; Bastos ACSF et al. 2017; Rangaswami H et al. 2006; Wai PY et al. 2004]; HGF, prodotto dalle hBMSC, come evidenziato da esperimenti effettuati in precedenza [Giannoni P et al. 2011; Gordin M et al. 2010]; c-Met, recettore per HGF normalmente prodotto dalle cellule B, quando lega HGF è in grado di innescare un aumento della sua stessa produzione da parte delle cellule B [Giannoni P et al. 2014].

I risultati dell'analisi sono i seguenti:



**Figura 11:** Livelli di espressione di DKK-1, OC, c-Met e HGF nelle cellule B di CLL in co-coltura con BMSC. Gli istogrammi rappresentano il valore medio di espressione del trascritto normalizzato rispetto al gene housekeeping (GAPDH) nei casi indicati (n). Le barre di errore rappresentano le SD. Per le valutazioni di significatività: \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ ; \*:  $0.01 < p < 0.05$ .

I dati evidenziano una tendenza positiva nell'espressione di tutti e quattro i geni rispetto ai controlli. Si osserva infatti un aumento statisticamente significativo nell'espressione dei geni OP, c-Met e HGF nelle cellule B in co-coltura con le BMSC rispetto al controllo. Nel caso di DKK-1 il gene non risulta invece espresso nel controllo, al contrario del campione in co-coltura in cui l'espressione è presente.

Nel loro insieme, dunque, i dati sin qui mostrati evidenziano un ovvio cross-talk a livello del microambiente midollare che si esprime anche tramite fattori secreti e che influenza reciprocamente i partner cellulari esaminati.

#### **4. Identificazione dei fattori di trascrizione responsabili della regolazione di HGF**

Come descritto nell'introduzione, gli studi svolti in precedenza hanno individuato in HGF uno dei fattori responsabili dell'influenza esercitata dalle cellule della nicchia midollare sulla sopravvivenza delle cellule di CLL. Pertanto, per indagare il ruolo di questa citochina nel cross-talk tra le cellule presenti nel microambiente midollare e le cellule B di CLL, si è deciso di individuare, tramite immunoprecipitazione della cromatina (ChIP), i TF responsabili della sua regolazione.

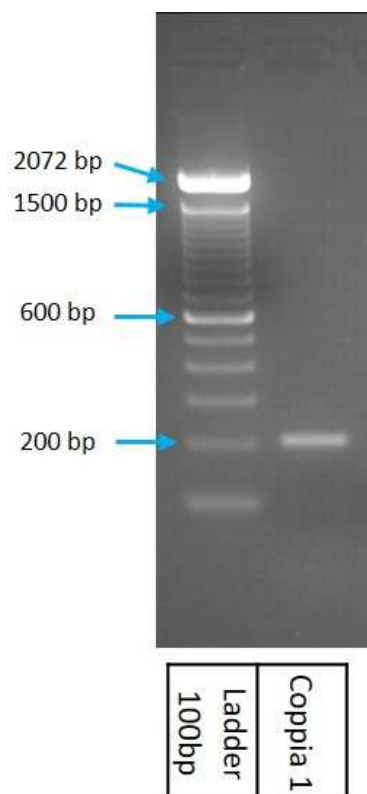
Sulla base delle sequenze responsive presenti sul promotore di HGF, della disponibilità commerciale di Ab e del ruolo dei TF in pathway di interesse per questo studio, sono stati per il momento scelti come TF bersaglio PPAR $\gamma$ , Ikaros, ER $\alpha$  e AP-2 $\alpha$ .

PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) in particolare è un fattore responsabile del differenziamento delle BMSC in adipociti [Barak Y et al. 1999; Rosen ED et al. 1999], e risulta essere un bersaglio particolarmente interessante, considerato il fatto che la CLL è nota per essere una malattia che colpisce principalmente le persone anziane, in cui le cellule staminali stromali vengono gradualmente sostituite da cellule adipose. In questo caso sarebbe possibile ipotizzare che lo stesso TF, presente in quantità elevata poiché responsabile del differenziamento in adipociti delle BMSC, agisca anche sulle cellule di CLL promuovendone la sopravvivenza.

Ikaros è un TF che svolge un ruolo cruciale nell'ematopoiesi, in particolare nel differenziamento dei linfociti. Il suo malfunzionamento è correlato all'insorgere di leucemie e linfomi [Georgopoulos K et al. 1994; Georgopoulos K 1997; Cobb BS et al. 2005; Winandy S et al. 1995].



Conseguentemente sono stati in seguito disegnati nuovi primer per le zone 1 e 8, e li si è testati sullo stesso campione di DNA genomico estratto da MG63 e sonicato. Solo la coppia per la zona 1 (HGF 1a Fw e HGF 1 Rev) è risultata funzionante, come mostrato in fig. 13.

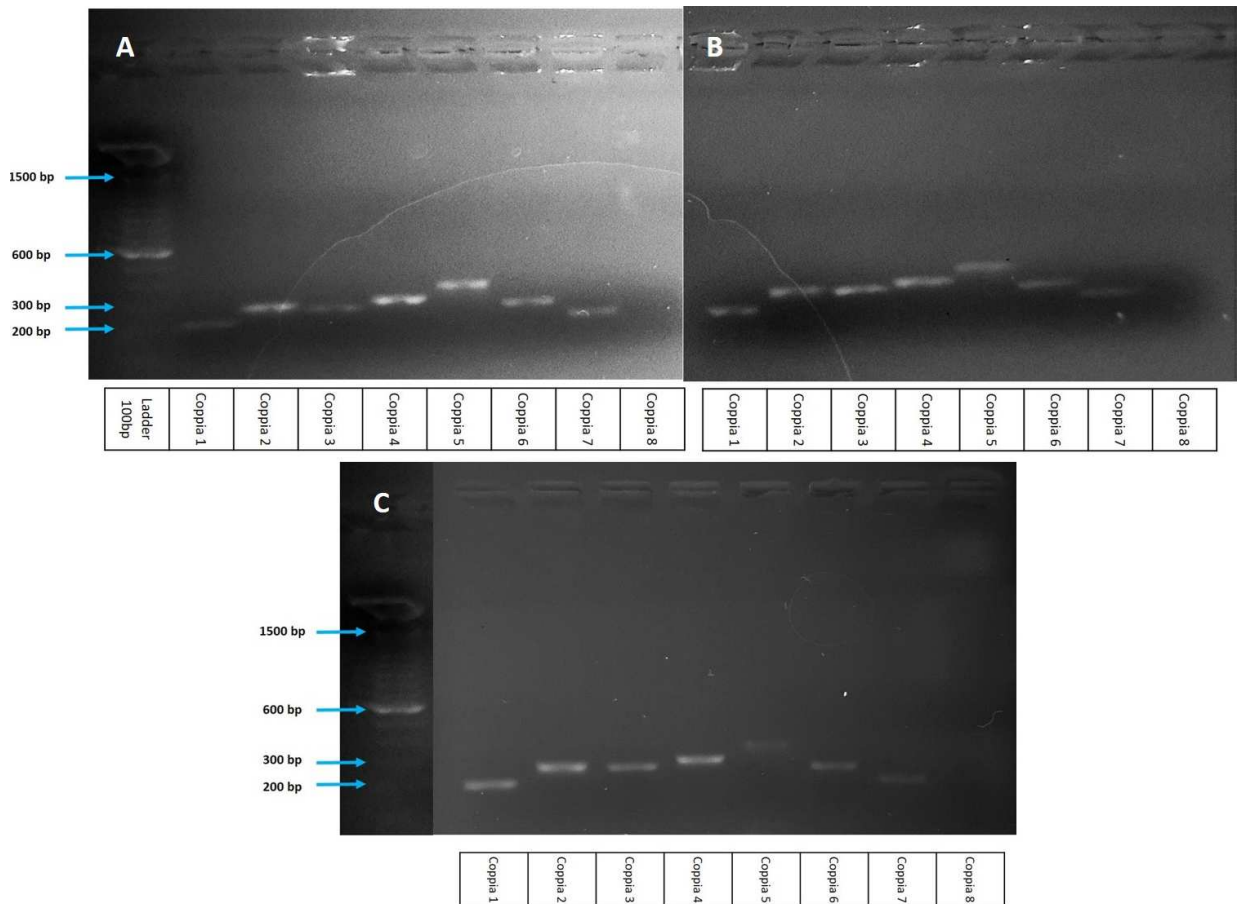


**Figura 13:** Separazione elettroforetica dell'amplificato ottenuto utilizzando la nuova coppia di primer per la zona 1: HGF 1a Fw e HGF 1 Rev.

A tutt'oggi i numerosi primer disegnati per la zona 8, contenente un tratto di DNA particolarmente complesso e molto ricco in guanine, non hanno consentito di ottenere un prodotto di PCR univoco e stabilmente amplificabile.

Si è comunque proceduto con l'estrazione della cromatina solubile da campioni delle tre linee cellulari di osteosarcoma scelte per l'esperimento: MG-63, HOS e SAOS-2.

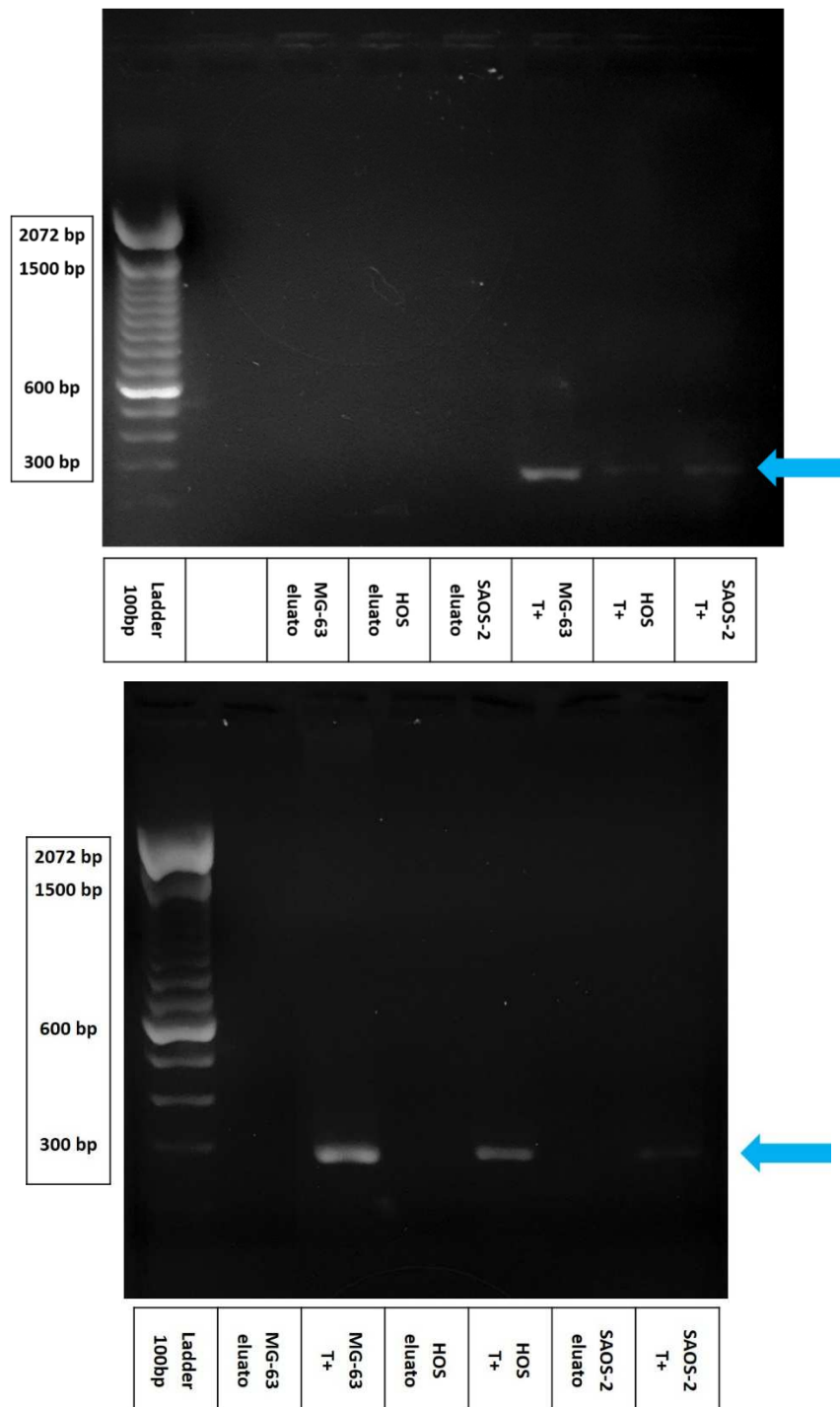
Su questi campioni di DNA genomico, passati in colonna di purificazione per eliminare i frammenti di dimensioni maggiori di 1000bp, sono stati innanzi tutto provati i primer per la PCR. Anche in questo caso, su tutti e tre i campioni, è stata confermata la funzionalità delle coppie di primer che individuano gli ampliconi da 1 a 7 (fig. 14).



**Figura 14:** Test dei primer su DNA genomico di MG-63 (A), HOS (B) e SAOS-2 (C) e relativi ampliconi separati per via elettroforetica.

Su questi tre campioni di cromatina solubile è stata poi effettuata due volte l'Immunoprecipitazione della cromatina utilizzando l'anticorpo in grado di legare il TF Ikaros, la purificazione sulle colonne per eliminare i frammenti di DNA di dimensioni eccessive e infine una PCR per amplificare il tratto di DNA del pHGF denominato zona 4, lunga 295 bp e comprendente la sequenza consensus di Ikaros.

Le sequenze così amplificate sono state poi separate tramite corse elettroforetiche su gel d'agarosio. Come mostrato in fig. 15, in entrambi i gel si nota una banda amplificata solo nei tre controlli positivi (T+), mentre gli eluati risultano negativi.



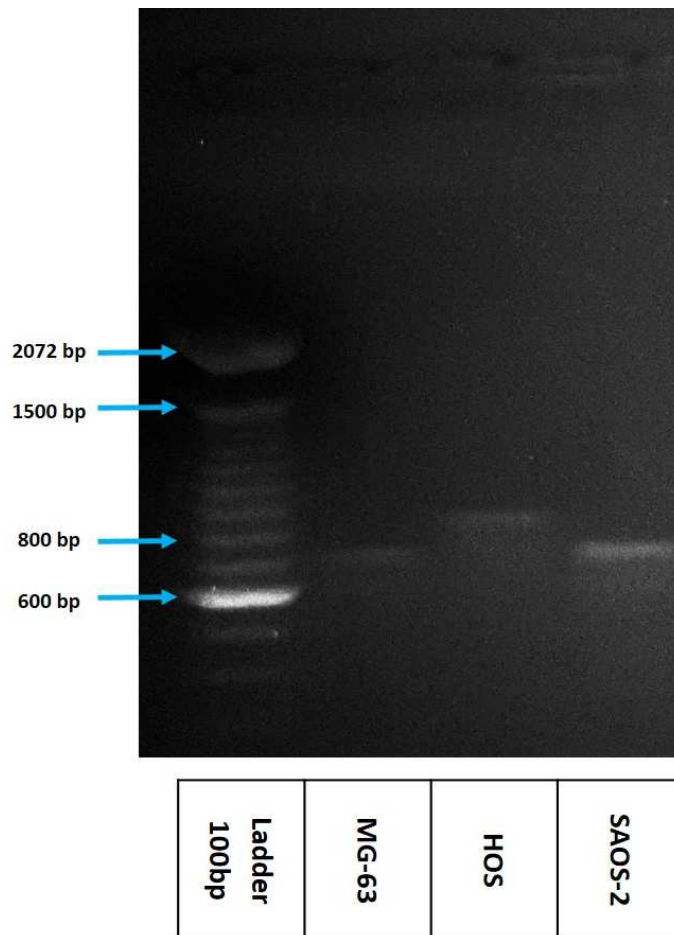
**Figura 15:** Elettroforesi effettuata in doppio, in evidenza la banda amplificata corrispondente alla zona 4, contenente la sequenza consensus di Ikaros.



Questo ciò indica che il TF Ikaros non fosse legato alla sua sequenza consensus sul promotore di HGF, e che quindi non sia coinvolto nella regolazione dell'espressione di HGF.

Per poter proseguire con l'analisi dei TF, e in particolare di PPAR $\gamma$ , si è reso necessario trovare dei primer in grado di amplificare la zona 8 di pHGF. A questo scopo, sono state effettuate diverse PCR, su DNA genomico delle tre linee cellulari purificato tramite le colonne, utilizzando diverse combinazioni di coppie di primer tra quelli disegnati per le zone 7, 8 e 9.

Al momento solo una coppia ha dato esito positivo: HGF 7 Fw e HGF 9 LB Rev. Essa ha amplificato una sequenza, lunga 632bp, individuata dalla banda visibile in fig. 16.



**Figura 16:** Separazione elettroforetica dell'amplificato ottenuto utilizzando la coppia di primer HGF 7 Fw e HGF 9 LB Rev.

L'amplicone ha le dimensioni attese nei campioni di MG-63 e SAOS-2, mentre nel campione di HOS risulta di dimensioni maggiori. L'effettiva funzionalità della coppia di primer andrà in futuro verificata e approfondita, prima di proseguire con le analisi sugli eluati ottenuti con l'anticorpo anti-PPAR $\gamma$ .

# ***DISCUSSIONE***

Da diversi anni è emerso chiaramente che le cellule di CLL e le cellule del microambiente midollare esercitano una reciproca influenza, che porta tra le principali conseguenze il prolungarsi della sopravvivenza del clone leucemico [Burger JA et al. 2009; Giannoni P et al. 2011; Giannoni P et al. 2014; Chiorazzi N et al. 2005; Reinart N et al. 2013] e un'erosione ossea, dovuta all'indebolimento della struttura trabecolare, soprattutto nelle fasi avanzate della malattia [Fiz F et al. 2014; Marini C et al. 2017; Giannoni P et al. 2016].

In particolare la letteratura ha messo in luce la correlazione tra il grado di erosione ossea e i livelli di RANKL. Questa citochina è coinvolta nel differenziamento degli osteoclasti ed è sovraespressa dalle cellule leucemiche nella CLL, pur non venendo rilasciata nell'ambiente circostante. Ne consegue che l'aumento del riassorbimento osseo nella CLL non sembra imputabile ad una maggiore stimolazione dell'osteoclastogenesi dovuta a RANKL [Bataille R et al. 1989; Roodman GD et al. 2009; Valentin-Opran A et al. 1982; Schmiedel BJ et al. 2013].

Studi successivi hanno quindi iniziato ad indagare il meccanismo alla base di questo fenomeno, mettendo in luce come l'alterazione della struttura ossea nella CLL possa dipendere da una contemporaneità di eventi, quali un aumento dell'osteoclastogenesi associato ad una concomitante riduzione delle attività osteoblastogeniche. I nostri studi sembrano confermare questa tesi.

Per approfondire il ruolo delle cellule di CLL nella diminuzione dell'osteoblastogenesi, sono stati condotti esperimenti su BMSC, osteoindotte e coltivate in presenza di cellule di CLL in condizioni atte a simulare le possibili interazioni presenti in vivo. Questi hanno permesso di verificare come, rispetto ai controlli, si verificano alterazioni nell'espressione di alcuni geni codificanti per marcatori propri del differenziamento osteogenico. In tutte le condizioni di coltura per le BMSC prese in considerazione (aggiunta di siero di pazienti malati di CLL (CLL-sr), aggiunta di mezzo condizionato da cellule B di CLL (CLL-cm), co-coltura a contatto e co-coltura in transwell con cellule B di CLL (rispettivamente CLL-co e CLL-tw)), i risultati hanno evidenziato differenze nell'espressione dei geni marker

scelti; in particolare OC e RUNX2, quest'ultimo considerato il gene master del differenziamento osteogenico, hanno mostrato una forte riduzione del livello di trascritto, rispetto ai controlli, in tutte le condizioni sperimentali; al contrario, DKK1, inibitore della via di Wnt, e come tale fattore che si contrappone al differenziamento osteogenico, risulta avere un'espressione fortemente aumentata nelle condizioni sperimentali. Da un lato quindi molecole presenti nel terreno condizionato prodotto dalla CLL inibiscono il differenziamento osteogenico, dall'altro stimolano l'espressione di fattori inibitori per le stesse vie.

Sebbene il quadro dei marker sia in via di completamento, i dati finora raccolti suggeriscono l'esistenza di un'effettiva influenza esercitata dalle cellule B di CLL sulle BMSC, che sembra ostacolare il loro differenziamento in senso osteoblastico. E' di particolare interesse il fatto che questa influenza sembri essere esercitata attraverso il rilascio di citochine nel microambiente, come dimostrato dal fatto che siano sufficienti i terreni condizionati, o i sieri dei pazienti, a causare i fenomeni osservati a carico dei diversi trascritti presi in considerazione, senza che sia necessaria la presenza delle cellule di CLL, a contatto diretto o meno, con le BMSC.

In aggiunta a quanto riportato si fa notare che esperimenti effettuati attraverso collaborazioni con altri laboratori ed Istituzioni hanno verificato che l'inibizione del differenziamento in osteoblasti delle BMSC è concomitante ad un'effettiva diminuzione della deposizione di matrice extracellulare (ECM). BMSC osteoindotte sono state infatti coltivate in presenza di CLL-cm e CLL-sr, e la matrice da esse depositata è stata colorata con Alizarina, mettendo in evidenza la riduzione di mineralizzazione nelle cellule trattate rispetto ai controlli. Analisi successive, mirate ad esplicitare il ruolo di specifiche citochine quale causa del fenomeno osservato, hanno messo in luce il probabile ruolo di TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-11 nell'inibizione del differenziamento delle BMSC in senso osteogenico. In effetti l'interdizione dell'attività di queste molecole, effettuata utilizzando anticorpi monoclonali, tra cui l'Infliximab, specificatamente in grado di contrastare TNF $\alpha$ , hanno generato un evidente ripristino della deposizione di ECM. Inoltre l'aumento di deposizione della matrice in conseguenza del blocco di TNF $\alpha$  è risultato più evidente, cosa che suggerisce un probabile ruolo di maggiore rilevanza di questa citochina.

Questi dati risultano inoltre in accordo con la letteratura, in cui è già stato descritto come il TNF $\alpha$  sia in grado di inibire la produzione di alcuni componenti della ECM e di down-regolare l'espressione di OC, Fosfatasi Alcalina e RUNX2 e di stimolare il riassorbimento osseo [Gowen M et al. 1988; Gilbert L et al. 2002; Bertolini DR et al. 1986; Nanes MS 2003].

La concentrazione del TNF $\alpha$ , rilasciato dalle cellule di CLL nei pazienti affetti [Foa R et al. 1990], sembra inoltre correlare con lo stato di avanzamento della malattia [Ferrajoli A et al. 2002] e dell'indebolimento osseo: livelli plasmatici più alti di questa citochina si trovano infatti nei pazienti con stati più avanzati di leucemia linfatica cronica e sono direttamente proporzionali allo stato di erosione ossea [Marini C et al. 2017]. E' di estremo interesse rilevare che TNF $\alpha$  ha un ruolo chiave in molte malattie infiammatorie, in particolar modo in quelle caratterizzate da alterazioni all'omeostasi ossea e dall'aumento del differenziamento degli osteoclasti (es: artrite reumatoide) [Colucci S et al. 2007; Dimitroulas T et al. 2013; Fantuzzi F et al. 2008].

TNF $\alpha$  è infatti risultato in grado di aumentare in modo significativo il differenziamento di osteoclasti multinucleati maturi, sia a partire da monociti di soggetti sani che di soggetti patologici per CLL, mentre l'azione dell'Infliximab sembra essere in grado di bloccare l'aumento di questo differenziamento in cellule trattate con CL-cm. Anche le interleuchine 11 e 6, insieme alla somministrazione di MCSF e CLL-cm, stimolano i monociti a differenziarsi solo fino ad uno stadio iniziale di osteoclasto, senza garantire il completamento in assenza di RANKL (dato concorde con la letteratura [Kim MS et al. 2006]). IL-11, IL-6 e TNF $\alpha$  sembrano quindi coinvolti in un meccanismo di ridondanza del segnale, per quanto concerne l'osteoclastogenesi. Recentemente, tuttavia, è stato dimostrato che l'effetto pro-osteoclastico del TNF $\alpha$  è esercitato solo grazie alla contemporanea azione di RANKL [Luo G et al. 2018].

RANKL svolge la sua funzione nel differenziamento dei monociti in osteoclasti legando il recettore RANK, in grado di attivare la trascrizione di diversi geni coinvolti nel pathway, tra cui NFATc1, il cui livello di espressione è stato incluso nei marcatori significativi per osteoclastogenesi ed indagati negli esperimenti proposti.

Per verificare l'influenza della CLL sull'aumento dell'osteoclastogenesi, infatti, sono stati utilizzati monociti, stimolati mediante RANKL e coltivati in presenza di MCSF e CLL-cm. E' stata quindi effettuata un'analisi dell'espressione degli mRNA di geni coinvolti nei processi di fusione e differenziamento degli osteoclasti: il già citato NFATc1, considerato il gene master del processo, MMP9, Catepsina K e DC-STAMP, caratteristici del fenotipo dell'osteoclasto [Amarasekara DS et al. 2018].

Il quadro finale dell'espressione di questi marcatori è tutt'ora in via di completamento, ma i dati raccolti finora indicano un aumento dell'espressione di NFATc1, MMP9 e Catepsina K in tutti i campioni coltivati con aggiunta di CLL-cm rispetto ai controlli, stimolati in coltura con i soli RANKL e MCSF. E' stato inoltre riscontrato un aumento dell'espressione della Catepsina K anche rispetto a campioni coltivati con aggiunta dei soli CLL-cm e MCSF, senza RANKL, dato che conferma nuovamente il ruolo fondamentale svolto da quest'ultima citochina.

I nostri dati di espressione sono coerenti con altre analisi, condotte in ambito di altre collaborazioni sperimentali, che hanno innanzi tutto mostrato come monociti attivati con RANKL e MCSF portino alla formazione di un numero maggiore di osteoclasti tri-nucleati e TRAP+ se coltivati in presenza di CLL-cm. Questi osteoclasti sono però mediamente di dimensioni minori rispetto a quelli ottenuti nei controlli, ma comunque funzionali. La loro coltura in piastre il cui fondo è ricoperto da uno strato di matrice mineralizzata sintetica o di dentina evidenzia infatti il permanere di capacità erosiva: misurando l'entità delle aree di riassorbimento di questa matrice è stato possibile dimostrare come queste fossero maggiori nei trattati (ovvero nelle colture di monociti stimolati con MCSF, RANKL e con l'aggiunta di CLL-cm), dove si trovavano gli osteoclasti più numerosi, sia di dimensioni comuni che di dimensioni minori, rispetto ai controlli.

In vivo sono state inoltre trovate cellule con caratteristiche dimensionali simili a questi osteoclasti appena descritti: in biopsie di midollo osseo provenienti da pazienti di CLL, accanto agli osteoclasti di dimensioni e forma canoniche, posizionati a contatto con l'osso trabecolare, sono stati infatti identificate cellule TRAP+ più piccole all'interno del midollo osseo. Queste sono inoltre risultate a

stretto contatto con le cellule B leucemiche, indicando un'assai probabile interazione tra i due tipi cellulari.

Una elevata incidenza di alterazioni ossee è stata riportata in diverse degenerazioni maligne delle cellule B, ed in letteratura erano già state fatte osservazioni circa l'esistenza di piccoli osteoclasti TRAP-positivi, di dimensioni decisamente inferiori a quelli riscontrabili ad esempio nei casi di mieloma multiplo, posizionati in corrispondenza di zone di riassorbimento osseo e in stretta vicinanza con cellule B maligne [Marcelli C et al. 1988; Chappard D et al. 1990].

Come già descritto, è noto inoltre che l'influenza tra cellule di CLL e microambiente è reciproca. La sopravvivenza dei cloni leucemici è infatti garantita in vivo dalle altre cellule presenti nelle nicchie midollari, tramite i contatti cellula-cellula e i segnali inter-cellulari. I meccanismi di questa influenza sono tuttavia conosciuti solo parzialmente e sono tutt'ora oggetto di indagine. Gli osteoclasti, ad esempio, sia quelli ottenuti tramite l'induzione di monociti con MCSF e RANKL, che le più piccole cellule tri-nucleate TRAP+, ottenute tramite il differenziamento con solo MCSF e CLL-cm, sono risultati in grado di supportare la sopravvivenza dei cloni leucemici in vitro, prevenendone l'apoptosi e promuovendone, in parte, la proliferazione.

Ciò suggerisce che gli osteoclasti siano tra quelle cellule, presenti nel microambiente stromale, in grado di influenzare le cellule leucemiche, favorendone la sopravvivenza.

Un altro aspetto di interesse, nei fenomeni di cross-talk tra cellule del microambiente e cellule di CLL, è il ruolo svolto dall'Osteopontina (OP), proteina componente della ECM mineralizzata espressa da diversi tipi cellulari, tra cui gli osteoblasti [Staines KA et al. 2012]. Questa proteina è un marcatore tardivo di differenziamento osteogenico, e presenta un'aumentata espressione nelle condizioni sperimentali CLL-sr, CLL-cm, CLL-co e CLL-tw. Al contrario di quanto successo con gli altri marker, però, in questo caso l'aumento sembra essere indotto anche dalla co-coltura con le cellule B sane: l'aumento di espressione del gene

sembra quindi indotto in generale dalle cellule B, indipendentemente dal fatto che siano sane o leucemiche. Dato che OP è un marker tardivo del differenziamento osteogenico si può supporre innanzi tutto che le BMSC, una volta iniziato il processo di differenziamento, riescano effettivamente a raggiungere le fasi terminali di tale processo, nonostante la presenza delle cellule B di CLL.

E' inoltre noto in letteratura che questa molecola è espressa anche in cellule non deputate alla deposizione di matrice ossea, quali cellule endoteliali, epiteliali, linfociti T, cellule dendritiche, macrofagi e gli stessi linfociti B, entrando a far parte di numerosi processi, quali la risposta immunitaria, la vascolarizzazione e l'infiammazione [Patarca R et al. 1989; Giachelli CM et al. 1995; Weber GF et al. 1996; Denhardt DT et al. 1998; Rothstein TL et al. 2009]. Sui linfociti B, l'OP svolge invece un ruolo promotore del loro differenziamento: in particolare essa è un attivatore delle cellule B policlonali, che sono di conseguenza stimulate alla produzione di Immunoglobuline [Iizuka J et al. 1998]. Il ruolo dell'OP in questi processi la rende coinvolta in numerose malattie autoimmuni e nella genesi di tumori solidi ed ematologici, tra cui la CLL, casi in cui la sua espressione risulta up-regolata [Rittling SR et al. 2015; Hao C et al. 2017; Bastos ACSF et al. 2017]. E' noto inoltre che gli stessi linfociti B, stimolati dall'IL-4 in caso di infezione, allergie o altre malattie, producono essi stessi l'OP, con conseguente attivazione delle altre cellule B circostanti [Rothstein TL et al. 2009].

In particolare, nel microambiente midollare, l'Osteopontina secreta dagli osteoblasti è responsabile della loro stessa quiescenza, impedendo la loro entrata nel ciclo cellulare, con conseguente riduzione dei progenitori osteoblastici disponibili per l'ulteriore differenziamento terminale.

L'espressione di OP è stata dunque esaminata, insieme a quella di altri trascritti, per valutare gli effetti delle BMSC sulle cellule B di CLL in condizioni di co-cultura. Gli altri geni considerati sono DKK-1 (anch'esso noto per la sua espressione alterata in diversi tumori), c-Met e HGF, perché facenti parte di un signaling specifico tra cellule B e BMSC.

I risultati ottenuti hanno evidenziato un aumento fortemente significativo per tutti e quattro i geni, indicando una probabile influenza delle cellule stromali nell'espressione genica delle cellule B. Sembra pertanto che nel sistema



sperimentale di cellule B di CLL e BMSC esista un'influenza reciproca fra i due tipi cellulari. Questo è già stato osservato in precedenza per quanto riguarda il signaling di c-Met e HGF: la vicinanza tra cellule B di CLL e BMSC porta ad un aumento continuo del loop di segnalazione e favorisce la sopravvivenza del clone leucemico.

Per quanto riguarda l'aumento dell'Osteopontina in entrambi i tipi cellulari (dato concorde con la letteratura riguardante le cellule B di CLL) si può ipotizzare che un qualche segnale presente in condizione di co-coltura sia in grado di stimolare l'espressione di OP non solo nei cloni leucemici, ma anche nelle BMSC.

Per quanto riguarda infine DKK-1, è noto in letteratura che solitamente nei tumori la sua espressione è diminuita. Visto l'aumento osservato in questi esperimenti, il suo livello di espressione e la sua eventuale funzionalità potrebbe essere oggetto di studi futuri.

Oggetto di particolare attenzione, nelle interazioni tra cellule di CLL e microambiente midollare, è stato inoltre il ruolo del Fattore di Crescita degli Epatociti (Hepatocyte Growth Factor, HGF), data la sua emergente rilevanza evidenziata da studi precedentemente pubblicati. HGF ha infatti la capacità di favorire la sopravvivenza della cellula di CLL agendo su due fronti: sia in modo diretto, legando il suo recettore c-Met e agendo tramite la fosforilazione di STAT3, e quindi sulle vie di segnale pro-sopravvivenza, che in modo indiretto, inducendo nei monociti il differenziamento in macrofagi M2, in grado di contrastare la risposta anti-tumorale dell'organismo; non a caso livelli di espressione di HGF serico nei pazienti di CLL sono maggiori rispetto a quelli di soggetti sani [Aguayo A et al. 2000].

Sulla base di queste premesse si è scelto quindi di approfondire il ruolo di questo fattore di crescita nel supporto alla vitalità delle cellule leucemiche nelle nicchie midollari, indagando in particolare modo i fattori di trascrizione responsabili della sua regolazione in questo tessuto.

Gli esperimenti hanno quindi iniziato la messa a punto di un sistema sperimentale atto ad individuare questi TF.

Individuato inizialmente il promotore del gene HGF (pHGF) sono state trovate le sequenze responsive di numerosi TF noti. Tra questi ne sono stati scelti alcuni ritenuti utili per questo studio, perché coinvolti in pathway di interesse (ematopoiesi, produzione della matrice ossea e cancerogenesi): PPAR $\gamma$ , Ikaros, ER $\alpha$  e AP-2 $\alpha$ . PPAR $\gamma$  in particolare, risulta essere di forte interesse, in quanto da una parte, in letteratura sono presenti dati che suggeriscono un suo possibile ruolo nella soppressione dell'espressione di HGF nel tessuto scheletrico (tramite il blocco della via di segnalazione RANK/RANKL), dall'altra è un TF coinvolto principalmente nel differenziamento delle BMSC in adipociti. Considerando che, in età avanzata, il midollo osseo tende ad essere progressivamente sostituito da tessuto adiposo, e che la CLL è una malattia che colpisce principalmente soggetti anziani, è assai probabile un suo importante coinvolgimento nella regolazione di un fattore che promuove la sopravvivenza delle cellule di CLL.

Gli studi svolti finora hanno permesso, tramite l'utilizzo dell'immunoprecipitazione della Cromatina, di verificare, su campioni di linee cellulari di osteosarcoma aventi diversa espressione di HGF, che il TF Ikaros non sembra essere deputato alla regolazione dell'espressione di questa citochina.

## ***Conclusioni e sviluppi futuri***

Complessivamente, quindi, i dati sin qui raccolti, portano ad indicare come l'erosione ossea e l'indebolimento della struttura trabecolare, presenti nelle fasi intermedie e avanzate della CLL, possano essere attribuite ad un'alterazione dell'equilibrio, presente in condizioni fisiologiche, tra la formazione dell'osso e il suo riassorbimento. Questo sembra essere dovuto ad una diminuzione del numero di cellule stromali che differenzia in osteoblasti, con conseguente diminuzione della deposizione di ECM, e ad un contemporaneo aumento del numero di monociti che differenzia in osteoclasti, con conseguente aumento del riassorbimento della matrice ossea stessa. Entrambi questi fenomeni sembrano in stretta correlazione con la vicinanza delle cellule B di CLL presenti nel midollo osseo, che esercitano la loro influenza sulle cellule stromali e i monociti tramite il rilascio di alcune citochine, tra le quali sembrano ricoprire un ruolo principale IL-11, IL-6 e soprattutto TNF $\alpha$ .

Proprio il ruolo di queste citochine è oggetto di esperimenti di approfondimento, attualmente in corso di svolgimento [Giannoni P et al. in revision]. E' inoltre in via di completamento il quadro dei geni marker utilizzati negli esperimenti di influenza delle cellule B di CLL su BMSC osteoindotte e di CLL-cm su monociti indotti al differenziamento verso l'osteoclastogenesi: si tratta rispettivamente dei geni SOST e DC-STAMP, la cui correlazione con gli esperimenti è stata già descritta in precedenza.

Nell'indagare invece il ruolo svolto da HGF nella sopravvivenza del clone leucemico, gli studi svolti finora hanno permesso di individuare quali possibili TF di interesse sul promotore del gene di HGF i seguenti: PPAR $\gamma$ , Ikaros, ER $\alpha$  e AP-2 $\alpha$ .

Utilizzando poi campioni di lisati provenienti da linee cellulari aventi differente espressione di HGF, è stato possibile verificare, tramite l'utilizzo dell'Immunoprecipitazione della Cromatina, che il TF Ikaros non sembra coinvolto nella regolazione del gene.

Altri studi, aventi lo scopo di indagare il coinvolgimento di PPAR $\gamma$ , sono al momento ancora in corso di svolgimento.

Un volta individuati i TF che regolano la trascrizione di HGF, lo studio proseguirà provando ad eseguire una modulazione di tali TF, per verificare se è possibile in questo modo agire sull'espressione di HGF.

Il passaggio successivo del progetto si propone di paragonare l'attività dei TF individuati in diversi tipi di cellule, per vedere se vi sono delle differenze. Innanzi tutto sarà necessario valutare se lo stesso tipo di regolazione avviene quando il linfocita da normale diventa patologico: per farlo bisognerà quindi controllare la presenza dei TF individuati in linfociti sani e linfociti di CLL, in modo da valutare se hanno la stessa distribuzione.

Sarà inoltre interessante valutare se la regolazione di HGF a carico dei TF individuati in cellule di linea mesenchimale presenta delle differenze rispetto a quella presente in cellule ematopoietiche.

Lo scopo ultimo del progetto è quello di individuare nella regolazione dei TF responsabili del controllo trascrizionale di HGF possibili bersagli per nuove terapie, cercando di bloccarne l'attività per impedire l'azione del fattore sulla sopravvivenza della cellula leucemica.

# BIBLIOGRAFIA

- Abed E, Bouvard B, Martineau X, Jouzeau JY, Reboul P, Lajeunesse D. *Elevated hepatocyte growth factor levels in osteoarthritis osteoblasts contribute to their altered response to bone morphogenetic protein-2 and reduced mineralization capacity.* Bone. 2015 Jun;75:111–9. [PubMed: 25667190]
- Abounader R, Laterra J. *Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis.* Neuro. Oncol. 2005; 7:436–451. [PubMed: 16212809]
- Aenlle KK, Curtis KM, Roos BA, Howard GA. *Hepatocyte growth factor and p38 promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.* Mol Endocrinol. 2014 May; 28(5):722-30. doi: 10.1210/me.2013-1286. Epub 2014 Mar 27.
- Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M. *Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes.* Blood. 2000;96(6):2240-5.
- Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. *Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks.* Immune network. 2018;18(1):e8.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. *PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development.* Mol Cell. 1999; 4:585– 595. [PubMed: 10549290]
- Bastos ACSF, Blunck CB, Emerenciano M, Gimba ERP. *Osteopontin and their roles in hematological malignancies: Splice variants on the new avenues.* Cancer Lett. 2017 Nov 1;408:138-143. doi: 10.1016/j.canlet.2017.08.022. Epub 2017 Aug 24

- Bataille R, Chappard D, Marcelli C, Dessauw P, Sany J, Baldet P, Alexandre C. *Mechanisms of bone destruction in multiple myeloma: the importance of an unbalanced process in determining the severity of lytic bone disease.* J Clin Oncol. 1989;7(12):1909-1914.
- Bau B, McKenna LA, Soeder S, Fan Z, Pecht A, Aigner T. *Hepatocyte growth factor/scatter factor is not a potent regulator of anabolic and catabolic gene expression in adult human articular chondrocytes.* Biochem Biophys Res Commun. 2004 Apr 16;316(4):984-90.
- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. *Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors.* Nature. 1986;319(6053):516-518.
- Boskey A, Gadaleta S, Gundberg C, Doty S, Ducy P, Karsenty G. *Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin.* Bone. 1998 Sep; 23(3):187–96. [PubMed: 9737340]
- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. *Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product.* Science. 1991; 251:802–804.
- Boyce BF, Xing L. *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin.* Arthritis Res Ther. 2007; 9 (Suppl 1):S1. [PubMed: 17634140]
- Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. *NF-kappaB-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis.* Endocrinol Metab (Seoul). 2015 Mar 27; 30(1):35–44. [PubMed: 25827455]
- Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. *Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis.* Eur Cell Mater. 2014 Oct 23;28:269-86.
- Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. *The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies.* Blood. 2009;114:3367–3375.

- Chappard D, Rossi JF, Bataille R, Alexandre C. *Osteoclast cytomorphometry and scanning electron microscopy of bone eroded surfaces during leukemic disorders*. Scanning microscopy. 1990;4(2):323-328.
- Chen HT, Tsou HK, Chang CH, Tang CH. *Hepatocyte growth factor increases osteopontin expression in human osteoblasts through PI3K, Akt, c-Src, and AP-1 signaling pathway*. PLoS One. 2012; 7(6):e38378. [PubMed: 22675553]
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med. 2005;352:804–815.
- Cipriani NA, Abidoye OO, Vokes E, Salgia R. *MET as a target for treatment of chest tumors*. Lung Cancer 2009; 63: 169–79.
- Cobb BS, Smale ST. *Ikaros-family proteins: in search of molecular functions during lymphocyte development*. Curr Top Microbiol Immunol. 2005;290:29-47.
- Colucci S, Brunetti G, Cantatore FP, Oranger A, Mori G, Quarta L, Cirulli N, Mancini L, Corrado A, Grassi FR, Grano M. *Lymphocytes and synovial fluid fibroblasts support osteoclastogenesis through RANKL, TNFalpha, and IL-7 in an in vitro model derived from human psoriatic arthritis*. The Journal of pathology. 2007;212(1):47-55.
- Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. *Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience*. Nat. Rev. Drug Discov. 2008; 7: 504–16.
- Courtial N, Smink JJ, Kuvardina ON, Leutz A, Gothert JR, Lausen J. *Tal1 regulates osteoclast differentiation through suppression of the master regulator of cell fusion DC-STAMP*. FASEB J. 2012; 26:523–532. [PubMed: 21990371]
- Date K, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. *HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotropic actions of hepatocyte growth factor*. FEBS Lett. 1997; 420: 1–6.

- Denhardt DT and Noda M. *Osteopontin expression and function: role in bone remodeling*. J Cell Biochem Suppl 30-31 (S30-31): 92-102, 1998
- Dimitroulas T, Nikas SN, Trontzas P, Kitas GD. *Biologic therapies and systemic bone loss in rheumatoid arthritis*. Autoimmunity reviews. 2013;12(10):958-966.
- Ding S, Merkulova-Rainon T, Han ZC, Tobelem G. *HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro*. Blood. 2003;101:4816–4822.
- Falgueyret JP, Oballa RM, Okamoto O, Wesolowski G, Aubin Y, Rydzewski RM, Prasit P, Riendeau D, Rodan SB, Percival. *Novel, nonpeptidic cyanamides as potent and reversible inhibitors of human cathepsins K and L*. J Med Chem 44:94–104.
- Fantuzzi F, Del Giglio M, Gisondi P, Girolomoni G. *Targeting tumor necrosis factor alpha in psoriasis and psoriatic arthritis*. Expert opinion on therapeutic targets. 2008;12(9):1085-1096.
- Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z, Koller CA, Kurzrock R, Thomas DA, Faderl S, Lerner S, O'Brien S, Albitar M. *The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia*. Blood. 2002;100(4):1215-1219.
- Fiorcari S, Maffei R, Audrito V, Martinelli S, Ten Hacken E, Zucchini P, Grisendi G, Potenza L, Luppi M, Burger JA, Deaglio S, Marasca R. *Ibrutinib modifies the function of monocyte/macrophage population in chronic lymphocytic leukemia*. Oncotarget. 2016;7:65968–65981.
- Fiz F, Marini C, Piva R, Miglino M, Massollo M, Bongioanni F, Morbelli S, Bottoni G, Campi C, Bacigalupo A, Bruzzi P, Frassoni F, Piana M, Sambuceti G. *Adult advanced chronic lymphocytic leukemia: computational analysis of whole-body CT documents a bone structure alteration*. Radiology. 2014;271(3):805-813.



- Foa R, Massaia M, Cardona S, Tos AG, Bianchi A, Attisano C, Guarini A, di Celle PF, Fierro MT. *Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease.* Blood. 1990;76(2):393-400
- Garcia S, Dales JP, Charafe-Jauffret E, Carpentier-Meunier S, Andrac-Meyer L, Jacquemier J, Andonian C, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. *Overexpression of c-Met and of the transducers PI3K, FAK and JAK in breast carcinomas correlates with shorter survival and neoangiogenesis.* Int. J. Oncol. 2007; 31:49–58. [PubMed: 17549404]
- Ge C, Xiao G, Jiang D, Franceschi RT. *Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development.* J Cell Biol. 2007 Feb 26;176(5):709-18. 10.1083/jcb.200610046
- Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, Molnar A, Wu P, Winandy S, Sharpe A. *The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages.* Cell. 1994 Oct 7;79(1):143-56.
- Georgopoulos K. *Transcription factors required for lymphoid lineage commitment.* Curr Opin Immunol. 1997 Apr;9(2):222-7.
- Georgopoulos K, Winandy S, Avitahl N. *The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis.* Annu Rev Immunol. 1997;15:155-76.
- Gherardi E, Gray J, Stoker M, Perryman M, Furlong R. *Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1989; 86:5844–5848. [PubMed: 2527367]
- Giachelli CM, Liaw L, Murry CE, Schwartz SM and Almeida M. *Osteopontin expression in cardiovascular diseases.* Ann NY Acad Sci 760: 109-126, 1995.

- Giannoni P, Scaglione S, Quarto R, Narcisi R, Parodi M, Balleari E, Barbieri F, Pattarozzi A, Florio T, Ferrini S, Corte G, de Toterò D. *An interaction between hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) prolongs the survival of chronic lymphocytic leukemic cells through STAT3 phosphorylation: a potential role of mesenchymal cells in the disease.* Haematologica. 2011 Jul;96(7):1015-23. doi: 10.3324/haematol.2010.029736. Epub 2011 Apr 12.
- Giannoni P, Pietra G, Travaini G, Quarto R, Shyti G, Benelli R, Ottaggio L, Mingari MC, Zupo S, Cutrona G, Pierri I, Balleari E, Pattarozzi A, Calvaruso M, Tripodo C, Ferrarini M, de Toterò D. *Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages.* Haematologica. 2014 Jun;99(6):1078-87. doi: 10.3324/haematol.2013.091405. Epub 2014 Feb 21.
- Giannoni P, Villa F, Cordazzo C, Zardi L, Fattori P, Quarto R, Fiorini M. *Rheological properties, biocompatibility and in vivo performance of new hydrogel-based bone fillers.* Biomaterials Science, 2016; 4:1691-1703.
- Giannoni P, Marini C, Cutrona G, Matis S, Capra MC, Puglisi F, Luzzi P, Pigozzi S, Neri A, Todoerti K, Morabito F, Ibatici A, Miglino M, Bergamaschi M, Bruno S, Sambuceti GM, Ravetti JL, Ferrarini M, Fais F, de Toterò D. *Chronic Lymphocytic Leukemia cells impair osteoblastogenesis and promote osteoclastogenesis: role of TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-11 cytokines.* Haematologica, in revision.
- Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Nanes MS. *Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor alpha.* J Biol Chem. 2002;277(4):2695-2701.
- Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K, Miyazaki H, Hashimoto S, Daikuhara Y. *Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure.* J. Clin. Invest. 1988; 81:414–419. [PubMed: 3276728]

- Gordin M, Tesio M, Cohen S, Gore Y, Lantner F, Leng L, Bucala R, Shachar I. *c-Met and its ligand hepatocyte growth factor/scatter factor regulate mature B cell survival in a pathway induced by CD74*. J Immunol. 2010 Aug 15;185(4):2020-31. doi: 10.4049/jimmunol.0902566. Epub 2010 Jul 16.
- Gowen M, MacDonald BR, Russell RG. *Actions of recombinant human gamma-interferon and tumor necrosis factor alpha on the proliferation and osteoblastic characteristics of human trabecular bone cells in vitro*. Arthritis Rheum. 1988;31(12):1500-1507.
- Grano M, Galimi F, Zambonin G, Colucci S, Cottone E, Zallone AZ, Comoglio PM. *Hepatocyte growth factor is a coupling factor for osteoclasts and osteoblasts in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 23; 93(15):7644–8.
- Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM. *Scatter factor induces blood vessel formation in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1993;90:1937–1941.
- Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ. *Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells*. J Bone Miner Res. 1999; 14:47–56. [PubMed: 9893065]
- Grumbles RM, Howell DS, Wenger L, Altman RD, Howard GA, Roos BA. *Hepatocyte growth factor and its actions in growth plate chondrocytes*. Bone. 1996 Sep; 19(3):255–61. [PubMed: 8873966]
- Hall BK and Miyake T. *The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis*. Anat Embryol (Berl). 1992 Jul;186(2):107-24.
- Hallek M. *Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment*. Am J Hematol. 2017;92:946–965.
- Hamilton E, Pearce L, Morgan L, Robinson S, Ware V, Brennan P, Thomas NS, Yallop D, Devereux S, Fegan C, Buggins AG, Pepper C. *Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells*. Br J Haematol. 2012 Sep;158(5):589-99.

- Hao C, Cui Y, Owen S, Li W, Cheng S, Jiang WG. *Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer*. Int J Mol Med. 2017 Jun;39(6):1327-1337. doi: 10.3892/ijmm.2017.2964. Epub 2017 Apr 21.
- Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. *Characterization of the Biological Roles of the Estrogen Receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , in Estrogen Target Tissues in Vivo through the Use of an ER $\alpha$ -Selective Ligand*. Endocrinology, Volume 143, Issue 11, 1 November 2002, Pages 4172–4177, <https://doi.org/10.1210/en.2002-220403>
- Heremans H, Billiau A, Cassiman JJ, Mulier JC, de Somer P. *In vitro cultivation of human tumor tissues. II. Morphological and virological characterization of three cell lines*. Oncology. 1978;35(6):246-52.
- Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, Gibellini F, Njuguna N, Lee E, Stennett L, Raghavachari N, Liu P, McCoy JP, Raffeld M, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Sherry R, Arthur DC, Maric I, White T, Marti GE, Munson P, Wilson WH, Wiestner A. *The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia*. Blood. 2011 Jan 13;117(2):563-74.
- Herman SE, Mustafa RZ, Jones J, Wong DH, Farooqui M, Wiestner A. *Treatment with ibrutinib inhibits BTK- and VLA-4-dependent adhesion of chronic lymphocytic leukemia cells in vivo*. Clin Cancer Res. 2015;21:4642–4651.
- Hoot KE, Oka M, Han G, Bottinger E, Zhang Q, Wang XJ. *HGF upregulation contributes to angiogenesis in mice with keratinocyte-specific Smad2 deletion*. J Clin Invest. 2010 Oct;120(10):3606-16. doi: 10.1172/JCI43304. Epub 2010 Sep 13.
- Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. *Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 30; 96(7):3540–5. [PubMed: 10097072]

- Hu ZX, Geng JM, Liang DM, Luo M, Li ML. *Hepatocyte growth factor protects human embryonic stem cell derived-neural progenitors from hydrogen peroxide-induced apoptosis*. Eur J Pharmacol. 2010 Oct 25;645(1-3):23-31. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.07.011. Epub 2010 Jul 23.
- Iizuka J, Katagiri Y, Tada N, Murakami M, Ikeda T, Sato M, Hirokawa K, Okada S, Hatano M, Tokuhisa T, Uede T. *Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies*. Lab Invest. 1998 Dec;78(12):1523-33.
- Imamura R, Matsumoto K. *Hepatocyte growth factor in physiology and infectious diseases*. Cytokine 98 (2017) 97–106.
- Inui T, Ishibashi O, Inaoka T, Origane Y, Kumegawa M, Kokubo T, Yamamura T. *Cathepsin K antisense oligodeoxynucleotide inhibits osteoclastic bone resorption*. J Biol Chem. 1997 Mar 28;272(13):8109-12.
- Islam R, Bae HS, Yoon WJ, Woo KM, Baek JH, Kim HH, Uchida T, Ryoo HM. *Pin1 regulates osteoclast fusion through suppression of the master regulator of cell fusion DC-STAMP*. J Cell Physiol. 2014; 229:2166–2174. [PubMed: 24891219]
- Jackson SP, Bartek J. *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature. 2009;461:1071–1078.
- Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T, Zbar B, Vande Woude GF. *Activating mutations for the Met tyrosine kinase receptor in human cancer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997; 94: 11445–50.
- Jung W, Castren E, Odenthal M, Vande Woude GF, Ishii T, Dienes HP, Lindholm D, Schirmacher P. *Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor c-met in mammalian brain*. J. Cell Biol. 1994; 126:485–494.
- Kay NE, Shanafelt TD, Strege AK, Lee YK, Bone ND, Raza A. *Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an "angiogenic switch"*. Leuk Res. 2007 Jul;31(7):899-906.

- Kaiser M, Mieth M, Liebisch P, Oberländer R, Rademacher J, Jakob C, Kleeberg L, Fleissner C, Braendle E, Peters M, Stover D, Sezer O, Heider U. *Serum concentrations of DKK-1 correlate with the extent of bone disease in patients with multiple myeloma.* Eur. J. Haematol. 80 (2008) 490–494.
- Ke HZ, Richards WG, Li X, Ominsky MS. *Sclerostin and Dickkopf-1 as Therapeutic Targets in Bone Diseases.* Endocr Rev. 2012 Oct;33(5):747-83. doi: 10.1210/er.2011-1060. Epub 2012 Jun 20.
- Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niino H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K. *Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia.* Cancer Cell. 2011;20:246–259.
- Kim JH and Kim N. *Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation.* J Bone Metab. 2014 Nov;21(4):233-41. doi: 10.11005/jbm.2014.21.4.233. Epub 2014 Nov 30.
- Kim JH and Kim N. *Signaling Pathway in Osteoclast Differentiation.* Chonnam Med J. 2016 Jan;52(1):12-7. doi: 10.4068/cmj.2016.52.1.12. Epub 2016 Jan 19.
- Kim MS, Day CJ, Selinger CI, Magno CL, Stephens SR, Morrison NA. *MCP-1-induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptorpositive but require receptor activator of NFkappaB ligand for bone resorption.* J Biol Chem. 2006;281(2):1274-1285.
- Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. *Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia.* Br J Haematol. 1999 Sep;106(4):995-1004.
- Kmiecik TE, Keller JR, Rosen E, Vande Woude GF. *Hepatocyte growth factor is a synergistic factor for the growth of hematopoietic progenitor cells.* Blood. 1992; 80:2454–2457.

- Kołat D, Kałuzińska Ż, Bednarek AK, Płuciennik E. *The biological characteristics of transcription factors AP-2 $\alpha$  and AP-2 $\gamma$  and their importance in various types of cancers*. Bioscience Reports (2019) 39 BSR20181928. <https://doi.org/10.1042/BSR20181928>
- Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP, Sivina M, Wierda WG, Estrov Z, Keating MJ, Shehata M, Jäger U, Gandhi V, Kay NE, Plunkett W, Burger JA. *Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance*. Blood. 2009 Sep 17;114(20):4441-50.
- Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, Kluth S, Bozic I, Lawrence M, Böttcher S, Carter SL, Cibulskis K, Mertens D, Sougnez CL, Rosenberg M, Hess JM, Edelman J, Kless S, Kneba M, Ritgen M, Fink A, Fischer K, Gabriel S, Lander ES, Nowak MA, Döhner H, Hallek M, Neuberg D, Getz G, Stilgenbauer S, Wu CJ. *Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse*. Nature. 2015; 526:525–530.
- Lark MW, Stroup GB, James IE, Dodds RA, Hwang SM, Blake SM, Lechowska BA, Hoffman SJ, Smith BR, Kapadia R, Liang X, Erhard K, Ru Y, Dong X, Marquis RW, Veber D, Gowen M. *A potent small molecule, nonpeptide inhibitor of cathepsin K (SB 331750) prevents bone matrix resorption in the ovariectomized rat*. Bone. 2002 May;30(5):746-53.
- Lee AY, He B, You L, Xu Z, Mazieres J, Reguart N, Mikami I, Batra S, Jablons DM. *Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 323 (2004) 1246–1250.
- Li Y, Wen X, Spataro BC, Hu K, Dai C, Liu Y. *Hepatocyte growth factor is a downstream effector that mediates the antifibrotic action of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists*. J Am Soc Nephrol. 2006 Jan;17(1):54-65. Epub 2005 Nov 16.
- Luo G, Li F, Li X, Wang ZG, Zhang B. *TNF $\alpha$  and RANKL promote osteoclastogenesis by upregulating RANK via the NF $\kappa$ B pathway*. Mol Med Rep. 2018;17(5):6605-6611

- Ma J, Zou C, Guo L, Seneviratne DS, Tan X, Kwon YK. *Novel death defying domain in Met entraps the active site of caspase-3 and blocks apoptosis in hepatocytes*. *Hepatology* 59 (2014) 2011–2022.
- Maffei R, Fiorcari S, Martinelli S, Potenza L, Luppi M, Marasca R. *Targeting neoplastic B cells and harnessing microenvironment: the “double face” of ibrutinib and idelalisib*. *J Hematol Oncol*. 2015;8:60
- Marcelli C, Chappard D, Rossi JF, Jaubert J, Alexandre C, Dessauw P, Baldet P, Bataille R. *Histologic evidence of an abnormal bone remodeling in B-cell malignancies other than multiple myeloma*. *Cancer*. 1988;62(6):1163-1170.
- Marini C, Bruno S, Fiz F, Campi C, Piva R, Cutrona G, Matis S, Nieri A, Miglino M, Ibatici A, Maria Orengo A, Maria Massone A, Neumaier CE, Totero D, Giannoni P, Bauckneht M, Pennone M, Tenca C, Gugliatti E, Bellini A, Borra A, Tedone E, Efe Türk H, Rosa F, Emionite L, Cilli M, Bagnara D, Brucato V, Bruzzi P, Piana M, Fais F, Sambuceti G. *Functional Activation of Osteoclast Commitment in Chronic Lymphocytic Leukaemia: a Possible Role for RANK/RANKL Pathway*. *Scientific reports*. 2017;7(1):14159.
- Matsubara H, Tsuchiya H, Watanabe K, Takeuchi A, Tomita K. *Percutaneous nonviral delivery of hepatocyte growth factor in an osteotomy gap promotes bone repair in rabbits: a preliminary study*. *Clin Orthop Relat Res*. 2008 Dec; 466(12):2962–72
- Matsumoto K, Matsumoto K, Nakamura T, Kramer RH. *Hepatocyte growth factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells*. *J. Biol. Chem*. 1994; 269: 31807–13.
- Matsumoto K, Nakamura T. *Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions*. *Int. J. Cancer* 2006; 119: 477–83.
- McAllister RM, Gardner MB, Greene AE, Bradt C, Nichols WW, Landing BH. *Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma*. *Cancer*. 1971 Feb;27(2):397-402. PMID: 5100401. DOI: 10.1002/1097-0142(197102)27:2<397::aid-cnrcr2820270224>3.0.co;2-x



- Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N. *In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells.* J Clin Invest. 2005 Mar;115(3):755-64.
- Miller CT, Lin L, Casper AM, Lim J, Thomas DG, Orringer MB, Chang AC, Chambers AF, Giordano TJ, Glover TW, Beer DG. *Genomic amplification of MET with boundaries within fragile site FRA7G and upregulation of MET pathway in esophageal adenocarcinoma.* Oncogene. 2006; 25:409–418.
- Montserrat E, Marques-Pereira JP, Gallart MT, Rozman C. *Bone marrow histopathologic patterns and immunologic findings in B-chronic lymphocytic leukemia.* Cancer. 1984 Aug 1;54(3):447-51.
- Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. *Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States. 1992–2001.* Blood. 2006;107:265–276.
- Nakagawa K, Takasawa S, Nata K, Yamauchi A, Itaya-Hironaka A Ota H, Yoshimoto K, Sakuramoto-Tsuchida S, Miyaoka T, Takeda M, Unno M, Okamoto H. *Prevention of Reg I-induced  $\beta$ -cell apoptosis by IL-6/dexamethasone through activation of HGF gene regulation.* Biochim Biophys Acta. 2013 Dec;1833(12):2988-2995. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.08.004. Epub 2013 Aug 14.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. *Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor.* Nature. 1989; 342:440–443. [PubMed: 2531289]
- Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Birchmeier W, Comoglio PM. *Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor.* Embo. J. 1991; 10:2867–2878.

- Nanes MS. *Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology*. Gene. 2003;321:1-15.
- Nardone V, D'Asta F, Brandi ML. *Pharmacological management of osteogenesis*. Clinics (Sao Paulo). 2014 Jun; 69(6):438–46.
- Neuss S, Becher E, Wöltje M, Tietze L, Jahnen-Dechent W. *Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing*. Stem Cells. 2004;22(3):405-14.
- Nilsson S, Gustafsson JÅ. Estrogen Receptors. *Therapies Targeted to Receptor Subtypes*. Clin Pharmacol Ther. 2011;89:44–55
- Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, Inoue R, Kitamura H, Tanaka T, Takahashi A, Asanuma H, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. *Prostate cancer stem-like cells/cancer-initiating cells have an autocrine system of hepatocyte growth factor*. Cancer Sci. 2013 Apr;104(4):431-6. doi: 10.1111/cas.12104. Epub 2013 Feb 17.
- Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z. *How proteases regulate bone morphogenesis*. Ann N Y Acad Sci. 2003 May;995:109-16.
- Paiva KB, Granjeiro JM. *Bone tissue remodeling and development: Focus on matrix metalloproteinase functions*. Arch Biochem Biophys. 2014 Nov 1;561:74-87. doi: 10.1016/j.abb.2014.07.034. Epub 2014 Aug 23.
- Pangalis GA, Roussou PA, Kittas C, Mitsoulis-Mentzikoff C, Matsouka-Alexandridis P, Anagnostopoulos N, Rombos I, Fessas P. *Patterns of bone marrow involvement in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic (well differentiated) non-Hodgkin's lymphoma. Its clinical significance in relation to their differential diagnosis and prognosis*. Cancer. 1984 Aug 15;54(4):702-8.
- Pangalis GA, Roussou PA, Kittas C, Kokkinou S, Fessas P. *B-chronic lymphocytic leukemia. Prognostic implication of bone marrow histology in 120 patients experience from a single hematology unit*. Cancer. 1987 Feb 15;59(4):767-71.

- Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, Regnier DC, Kozak CA, Mock BA, Morse HC 3rd, Jerrells TR, Cantor H. *Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection.* J Exp Med 1989; 170: 145–61.
- Peghini PL, Iwamoto M, Raffeld M, Chen YJ, Goebel SU, Serrano J, Jensen RT. *Overexpression of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor receptors in a proportion of gastrinomas correlates with aggressive growth and lower curability.* Clin. Cancer Res. 2002; 8:2273–2285. [PubMed: 12114431]
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.* Science. 1999; 284:143–7. [PubMed: 10102814]
- Pollard JW. *Trophic macrophages in development and disease.* Nature Reviews Immunology, vol. 9, no. 4, pp. 259–270, 2009.
- Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, Reeve J. *Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation.* FASEB J. 2005; 19(13):1842–1844. [PubMed: 16123173]
- Poundarik AA, Diab T, Sroga GE, Ural A, Boskey AL, Gundberg CM, Vashishth D. *Dilatational band formation in bone.* Proc Natl Acad Sci. 2012; 109(47):19178–83. [PubMed: 23129653]
- Proto JD, Tang Y, Lu A, Chen WC, Stahl E, Poddar M, et al. *NF-kappaB inhibition reveals a novel role for HGF during skeletal muscle repair.* Cell Death Dis. 2015; 6:e1730. [PubMed: 25906153]

- Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, Munar M, Rubio-Pérez C, Jares P, Aymerich M, Baumann T, Beekman R, Belver L, Carrio A, Castellano G, Clot G, Colado E, Colomer D, Costa D, Delgado J, Enjuanes A, Estivill X, Ferrando AA, Gelpí JL, González B, González S, González M, Gut M, Hernández-Rivas JM, López-Guerra M, Martín-García D, Navarro A, Nicolás P, Orozco M, Payer ÁR, Pinyol M, Pisano DG, Puente DA, Queirós AC, Quesada V, Romeo-Casabona CM, Royo C, Royo R, Rozman M, Russiñol N, Salaverría I, Stamatopoulos K, Stunnenberg HG, Tamborero D, Terol MJ, Valencia A, López-Bigas N, Torrents D, Gut I, López-Guillermo A, López-Otín C, Campo E. *Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. Nature. 2015;526: 519–524.
- Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, López-Guerra M, Colomer D, Tubío JM, López C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernández JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Costa D, Carrió A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernández L, Yagüe J, Nicolás P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjosé S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpí JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigó R, Bayés M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, López-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, López-Otín C, Campo E. *Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. Nature. 2011;475:101–105.
- Puri N, Ahmed S, Janamanchi V, Tretiakova M, Zumba O, Krausz T, Jagadeeswaran R, Salgia R. *c-Met is a potentially new therapeutic target for treatment of human melanoma*. Clin. Cancer Res. 2007; 13:2246–2253.
- Qiang YW, Chen Y, Stephens O, Brown N, Chen B, Epstein J, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. *Myelomaderived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma*. Blood 112 (2008) 196–207.

- Rahimi N, Tremblay E, McAdam L, Park M, Schwall R, Elliott B. *Identification of a hepatocyte growth factor autocrine loop in a murine mammary carcinoma*. Cell Growth Differ. 7 (1996) 263–270.
- Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. *Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression*. Trends Cell Biol. 16 (2) (2006) 79–87.
- Ranheim EA, Kipps TJ. *Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal*. J Exp Med. 1993 Apr 1;177(4):925-35.
- Reinart N, Nguyen PH, Boucas J, Rosen N, Kvasnicka HM, Heukamp L, Rudolph C, Ristovska V, Velmans T, Mueller C, Reiners KS, von Strandmann EP, Krause G, Montesinos-Rongen M, Schlegelberger B, Herling M, Hallek M, Fingerle-Rowson G. *Delayed development of chronic lymphocytic leukemia in the absence of macrophage migration inhibitory factor*. Blood. 2013;121:812–821.
- Rittling S R, Singh R. *Osteopontin in Immune-mediated Diseases*. Journal of Dental Research 2015, Vol. 94(12) 1638–1645.
- Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA. *Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties*. Cancer Res. 1987;47:4961.
- Rodrigues GA, Naujokas MA, Park M. *Alternative splicing generates isoforms of the met receptor tyrosine kinase which undergo differential processing*. Mol. Cell. Biol. 1991; 11:2962–2970. [PubMed: 1710022]
- Rothstein TL, Guo B. *Receptor crosstalk: reprogramming B cell receptor signalling to an alternate pathway results in expression and secretion of the autoimmunity-associated cytokine, osteopontin*. J Intern Med. 2009 Jun;265(6):632-43. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02103.x.
- Roodman GD. *Pathogenesis of myeloma bone disease*. Leukemia. 2009;23(3):435-441.

- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. *PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro*. Mol Cell. 1999; 4:611–617. [PubMed: 10549292]
- Rozman C, Montserrat E. *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med. 1995;333:1052–1057.
- Sattler M, Salgia R. *The MET axis as a therapeutic target*. Update Cancer Ther. 2009; 3: 109–18.
- Schmiedel BJ, Scheible CA, Nuebling T, Kopp HG, Wirths S, Azuma M, Schneider P, Jung G, Grosse-Hovest L, Salih HR. *RANKL expression, function, and therapeutic targeting in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Res. 2013;73(2):683-694.
- Smith MM, Hall BK. *Development and evolutionary origins of vertebrate skeletogenic and odontogenic tissues*. Biol Rev Camb Philos Soc. 1990 Aug;65(3):277-373.
- Standal T, Abildgaard N, Fagerli UM, Stordal B, Hjertner O, Borset M, Sundan A. *HGF inhibits BMP-induced osteoblastogenesis: possible implications for the bone disease of multiple myeloma*. Blood. 2007 Apr 1; 109(7):3024–30. [PubMed: 17138824]
- Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. *Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation*. Physiol Rev. 1996; 76:593–629. [PubMed: 8618964]
- Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. *The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling*. J Endocrinol. 2012;214:241–55.
- Stellrecht CM, Phillip CJ, Cervantes-Gomez F, Gandhi V. *Multiple myeloma cell killing by depletion of the MET receptor tyrosine kinase*. Cancer Res. 2007; 67:9913–9920. [PubMed: 17942923]

- Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. *Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts.* Dev Cell. 2002;3(6):889–901.
- Turner PJ, Chen CG, Ionova-Martin S, Sun L, Harman A, Porter A, Ager JW 3rd, Ritchie RO, Alliston T. *Osteopontin deficiency increases bone fragility but preserves bone mass.* Bone. 2010; 46(6):1564–73. [PubMed: 20171304]
- Teitelbaum SL. *Bone resorption by osteoclasts.* Science. 2000 Sep 1; 289(5484):1504–8. [PubMed: 10968780]
- Valentin-Opran A, Charhon SA, Meunier PJ, Edouard CM, Arlot ME. *Quantitative histology of myeloma-induced bone changes.* Br J Haematol. 1982;52(4):601-610.
- Vandewoestyne ML, Pede VC, Lambein KY, Dhaenens MF, Offner FC, Praet MM, Philippé JJ, Kipps TJ, Deforce DL. *Laser microdissection for the assessment of the clonal relationship between chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma and proliferating B cells within lymph node pseudofollicles.* Leukemia. 2011 May;25(5):883-8.
- Wai PY, Kuo PC. *The role of osteopontin in tumor metastasis.* J Surg Res. 2004 Oct;121(2):228-41.
- Watson L, Wyld P, Catovsky D. *Disease burden of chronic lymphocytic leukemia within the European Union.* Eur J Haematol. 2008;81:253–258.
- Watt FM. *Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis.* Curr Opin Genet Dev. 2001; 11:410–7. [PubMed: 11448627]
- Weber GF, Cantor H. *The immunology of Eta-1/osteopontin.* Cytokine Growth Factor Rev 7: 241-248, 1996.
- Wen Q, Jin D, Zhou CY, Zhou MQ, Luo W, Ma L. *HGF-transgenic MSCs can improve the effects of tissue self-repair in a rabbit model of traumatic osteonecrosis of the femoral head.* PLoS One. 2012; 7(5):e37503.

- Winandy S, Wu P, Georgopoulos K. *A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma.* Cell, 83 (2) (1995)
- Xie Q, Bradley R, Kang L, Koeman J, Ascierto ML, Worschech A, De Giorgi V, Wang E, Kefene L, Su Y, Essenburg C, Kaufman DW, DeKoning T, Enter MA, O'Rourke TJ, Marincola FM, Vande Woude GF. *Hepatocyte growth factor (HGF) autocrine activation predicts sensitivity to MET inhibition in glioblastoma.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109 (2012) 570–575.
- Yavropoulou MP, Yovos JG. *Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives.* J Musculoskelet Neuronal Interact. 2008 Jul-Sep;8(3):204-16.
- Yi S, Tsao MS. *Activation of hepatocyte growth factor-met autocrine loop enhances tumorigenicity in a human lung adenocarcinoma cell line.* Neoplasia 2 (2000) 226–234.
- Yin J, Lee JH, Zhang J, Gao Z, Polotsky VY, Ye J. *Regulation of hepatocyte growth factor expression by NF-kappaB and PPARgamma in adipose tissue.* Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014 Apr 15; 306(8):E929–36. [PubMed: 24569592]
- Zarnegar R. *Regulation of HGF and HGFR gene expression.* Exs. 1995; 74:33–49. [PubMed: 8527900]
- Zhang C, Dou C, Xu J, Dong S. *DC-STAMP, the key fusion-mediating molecule in osteoclastogenesis.* J Cell Physiol. 2014; 229:1330–1335. [PubMed: 24420845]