

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Chirurgia Epatobiliare e
Gastroenterologica Avanzata e Fisiopatologia
dell'Apparato Digerente

Ciclo XXIV

IL RUOLO DEL CD133 NEL CANCRO
COLORETTALE

Coordinatore:
Chiar.mo Prof.M. Sianesi

Tutor:
Chiar.mo Prof.P. Del Rio

Dottorando: Dr.ssa Lamia Bezer

1.INTRODUZIONE

1.1 LE CELLULE STAMINALI

Negli ultimi anni si è sviluppato un crescente interesse attorno al concetto di "**cancer stem cells**", cellule staminali tumorali, che avrebbe messo in discussione la teoria della mutazione somatica, anche conosciuta come **teoria stocastica**, dello sviluppo di neoplasia.

La **teoria della mutazione somatica**, la più diffusa negli ultimi 50 anni, sostiene che il cancro sia derivato da una singola cellula somatica che ha accumulato multiple mutazioni genetiche. Queste mutazioni generalmente avvengono su geni che controllano la proliferazione, la differenziazione o l'apoptosi e sono tali da conferire a questa cellula un potenziale proliferativo illimitato e scarsa dipendenza dall'ambiente circostante. Le cellule figlie sarebbero anch'esse vittime di successive mutazioni genomiche e di conseguenza la massa tumorale prodotta avrebbe origine monoclonale ma caratteristiche genotipiche e fenotipiche eterogenee e progressivamente più resistenti.

Secondo la **nuova teoria staminale** invece, sarebbe solo una minima parte delle cellule tumorali a sostenere la proliferazione neoplastica, la parte che mantiene le caratteristiche di cellule staminali e che ha di per sé caratteristicamente un potenziale proliferativo illimitato. ¹⁻³

Ad esempio si è visto che le cellule staminali ematopoietiche di ratto sono in grado di espandersi esponenzialmente durante la fase embrionale ed all'inizio dello sviluppo fetale,

raddoppiando di numero quotidianamente durante la gestazione. Se la velocità di divisione si mantenesse tale, il topo peserebbe un equivalente di 1.4 tonnellate alla nascita. ⁴

Le caratteristiche peculiari delle cellule staminali sono la loro abilità di **self renewal**, cioè autorigenerativa, ma anche la capacità di produrre cellule che si differenziano in forme più mature, o **multilineage differentiation** (differenziazione multilineare). La duplicazione cellulare avviene tramite due meccanismi. Per **divisione asimmetrica**, tramite la quale sono prodotte una cellula staminale figlia (rigenerazione) ed una cellula differenziata (vedi Fig. 1) ⁵⁻¹⁰

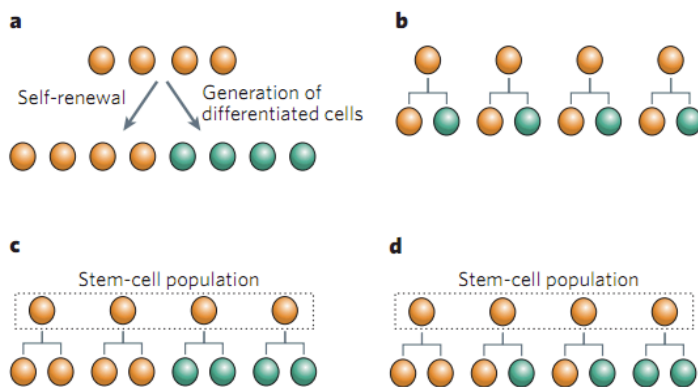


Fig 1. Strategie di duplicazione delle cellule staminali, da SJ. Morrison and J.Kimble from Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer NATURE Vol 441, 29 June 2006 ⁴

Oppure per **divisione simmetrica**, in cui da una cellula madre vengono generate due cellule figlie entrambe differenziate (Fig. 1b). ^{4, 11-16}

Le cellule staminali sono responsabili dell'omeostasi dei tessuti, garantiscono il ricambio cellulare (divisione asimmetrica) come anche la riparazione dei tessuti dopo un insulto (prevalentemente tramite divisione simmetrica); inizialmente si ipotizzò che in condizioni di normalità fossero quiescenti e che si replicassero attivamente solo per ripopolare un tessuto danneggiato. ¹⁷⁻²⁰

L'ipotesi iniziale era che la nuova cellula staminale generata dalla divisione asimmetrica mantenesse il filamento di DNA originario così da minimizzare gli errori di replicazione di DNA, fenomeno noto come "ipotesi della catena immortale".²¹⁻²²

Studi con marcatura di DNA con bromodesossipuridina dimostrarono invece che la persistenza del DNA originario era variabile.²³⁻²³ Esperimenti più recenti, eseguiti con metodi immunocitochimici ed anticorpi monoclonali verso marker di superficie, hanno confermato che molte delle cellule staminali non sembrano in stato di quiescenza ma che anzi si dividono quotidianamente.^{20, 24-25}

Le cellule staminali possono seguire modelli di divisione totalmente simmetrici, totalmente asimmetrici ma più comunemente una combinazione tra i due (Fig. 1c-1d).

Per mantenere un adeguato numero di cellule staminali e differenziate per ogni tessuto la scelta tra divisione simmetrica ed asimmetrica sarebbe controllata da segnali di sviluppo, cosiddetti intrinseci, e da segnali ambientali (del microambiente/niche, cioè estrinseci).¹

Le cellule staminali sono definite totipotenti (in grado di generare un individuo in toto, per esempio l'embrione umano), pluripotenti (in grado di generare quasi tutti i tessuti del corpo umano) ed infine **multipotenti** (capaci di generare più tipi cellulari in un determinato territorio) a seconda del loro progressivo livello di differenziazione e di sviluppo.

Nell'individuo adulto esistono cellule staminali multipotenti con potenziale di self renewal ma già *committed* verso una linea differenziativa specifica.

Nel tessuto colico, le cellule staminali risiedono alla base delle cripte in una **niche** (nicchia), contenente **miofibroblasti intestinali subepiteliali**. Si è inizialmente

ipotizzato che ogni cripta, tranne che nel feto e nel neonato, fosse monoclonale e che tutte le cellule ivi residenti fossero la progenie di una unica cellula staminale multipotente (vedi Fig.2).²⁶ Successivamente altri studi evidenziarono che alla base di ogni cripta esisterebbero un numero variabile da 5 a 16 cellule multipotenti.^{20,27}

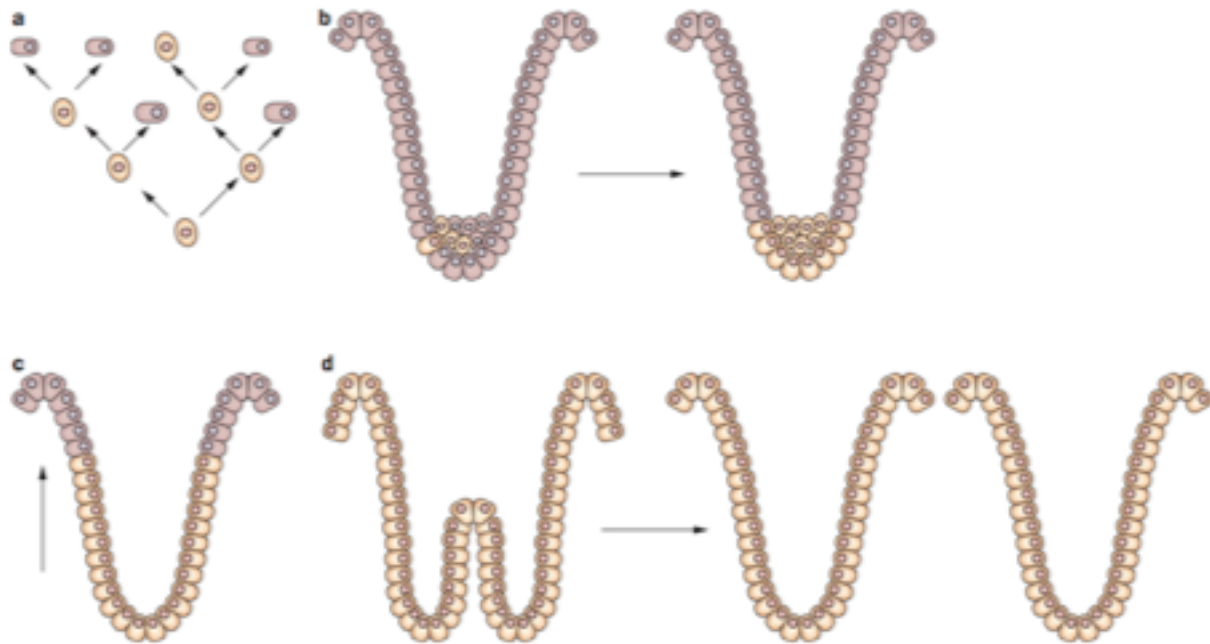


Fig 2 Monoclonalita' delle cripte Zeki et al Stem cells and their implications for colorectal cancer Wright Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 8, 90-100,February 2011 ²⁸

Capire a fondo i meccanismi che regolano il microambiente o niche (nicchia) è di fondamentale importanza perché le cellule staminali non sono *self-determinants* ma strettamente regolate da cellule adiacenti, matrice extracellulare e fattori solubili.

La nicchia della cellula staminale, **stem cell niche**, è il microambiente dove la cellula staminale risiede all'interno di ogni tessuto; la niche regola l'attività di *self renewal* e la rigenerazione tissutale attraverso complessi meccanismi di interazione cellula-cellula, nonché attraverso la presenza di fattori di crescita (Fig. 3).²⁸⁻³⁰

L'importanza del microambiente nella regolazione della maturazione, differenziazione e proliferazione cellulare è dimostrata anche del fatto che la sua manipolazione può indurre l'insorgenza del cancro ed aumentare il potenziale tumorigenico delle CST dopo xenotrapianto.³¹⁻³²

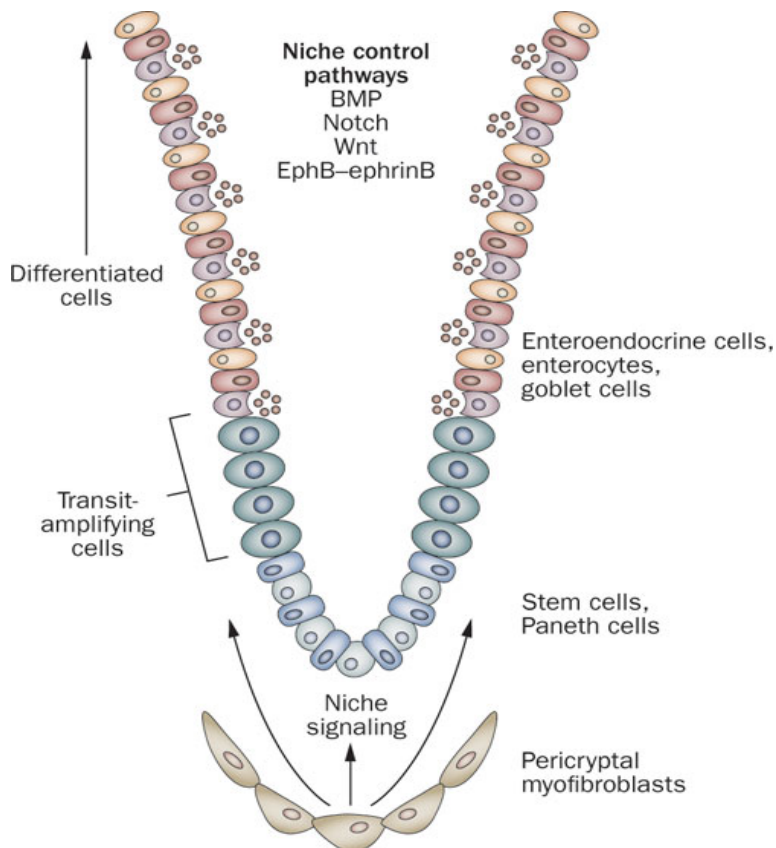


Fig.3 Rappresentazione della Niche intestinale

Da Stem cells and their implications for colorectal cancer S. Zeki et al Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 8, 90-100 February 2011²⁸

La niche è determinante anche per la **plasticità** della cellula staminale, la capacità di differenziarsi in cellule fenotipicamente e funzionalmente diverse; infatti cellule staminali rimosse dal loro ambiente di appartenenza perdono la loro funzione e la loro differenziazione.^{29, 31}

Vermeulen et al hanno osservato che fattori secreti dai miofibroblasti intestinali, componente chiave della niche, possono prevenire la differenziazione morfologica e

molecolare delle CST e anzi promuovere il ritorno alla staminalità in CST già differenziate, sia in vivo che in vitro. ³³

Orimo et al dimostrarono in uno studio su popolazioni di carcinoma mammario come nelle il cotrapianto di fibroblasti derivati da tessuto tumorale aumentasse in maniera sostanziale la crescita neoplastica per stimolazione paracrina da parte di fattori di crescita prodotti dai fibroblasti stessi. ³⁴

La staminalità quindi non sarebbe solamente una proprietà intrinseca di una specifica cellula ma sarebbe influenzata da l'ambiente circostante ed una cellula staminale multipotente può differenziarsi in molteplici tipi cellulari anche non tessuto od organo-specifici. ³⁵⁻⁴¹

I tumori generati nel contesto di una infiammazione cronica spiegano infatti il ruolo di un microambiente difettoso, invece un microambiente sano e ben funzionante può aiutare la prevenzione del cancro anche in presenza di modificazioni genetiche cellulari predisponenti. ³¹

La niche delle cellule staminali intestinali è localizzata nelle cripte ed esiste evidenza che dimostra come proprio quella sia la sede dell'iniziale proliferazione neoplastica. ¹⁹

L'anatomia delle cripte intestinali è particolarmente adatta per studiare le cellule staminali e le loro niche. **L'epitelio intestinale murino** si replica ogni 5 giorni e le cellule staminali sono localizzate alla base di queste cripte, ogni cripta contiene da 6 a 19 cellule staminali. Le cellule staminali generano "transit-amplifying cell" (TAC), più differenziate e non più multipotenti, che si dividono ogni 12-16 ore generando una popolazione di circa 300 cellule per cripta ogni giorno. Queste cellule risiedono nella cripta per 48 ore e si

dividono fino a 5 volte mentre migrano verso l'apice delle cripte.¹⁹ Quando queste cellule TAC raggiungono la giunzione cripta-villo, si differenziano rapidamente e questo processo continua durante il resto della loro migrazione fino all'apice dove poi vanno incontro all'apoptosi ed esfoliano nel lume ghiandolare o vengono digerite dalle cellule stromali.^{27, 42} La dipendenza dalla niche pertanto limita l'espansione delle cellule staminali (vedi Fig.4).

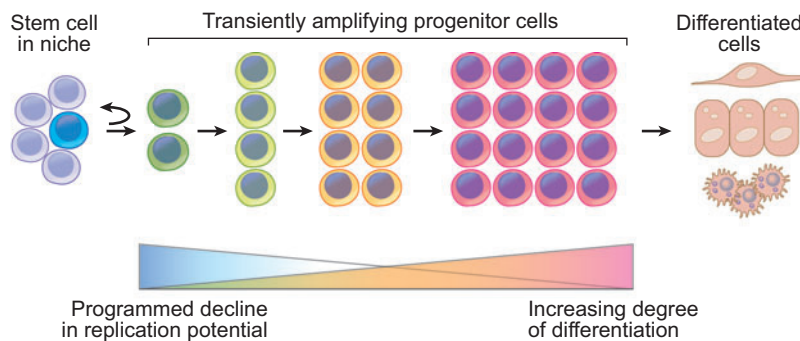


Fig 4 La dipendenza dalla niche delle normali cellule staminali ne limita l'espansione - da Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:675-99 ⁴²

Queste cellule differenziate hanno una vita più breve rispetto alla cellula staminale progenitrice, pertanto avrebbero anche una probabilità inferiore di accumulare una serie di mutazioni genetiche sufficienti a generare il cancro.^{24,35,43} (vedi Fig.5)

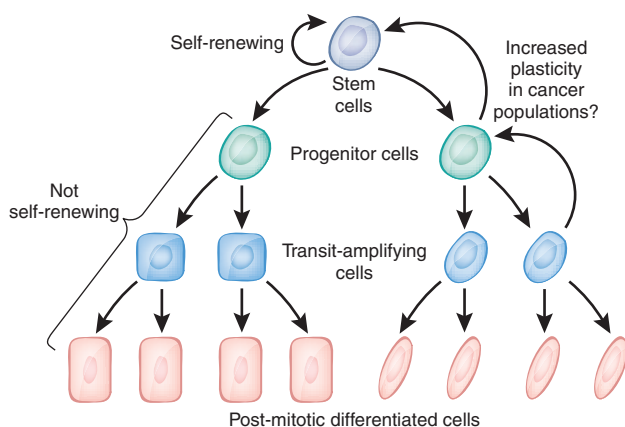


Fig.5 Gerarchia differenziativa staminale da Gupta, C et al Cancer stem cells: mirage or reality? *Nature Medicine* 15, 1010 - 1012 (2009) ⁴³

1.2 CELLULE STAMINALI E CANCRO

Esperimenti in vitro ed in vivo dimostrarono come solo una piccola parte delle popolazione cellulare all'interno del tumore sia capace di proliferare in maniera estesa. E' stato ipotizzato che questa parte fosse costituita da cellule staminali, in seguito a perdita dei meccanismi di regolazione.

L'evidenza mostra che le mutazioni geniche che provocherebbero la progressione verso la neoplasia, potrebbero manifestarsi fenotipicamente nella cellula staminale dopo lunghi periodi o anche dopo poche settimane. Quest'ultimo per esempio è il caso delle **transient-amplifying cells** che in seguito a mutazioni di APC (proteina dell'*adenomatous polyposis coli* codificata dall'omonimo gene oncosoppressore) vanno in conto a rapida trasformazione adenomatosa nel giro di 3 -5 settimane.^{19,44-45}

Diversi parallelismi sono stati evidenziati tra le cellule staminali e le cellule staminali tumorali.

Entrambe le linee cellulari sono capaci di autorigenerarsi, sebbene le cellule staminali in maniera regolata, ed entrambe hanno capacità di multilineage differentiation.¹⁻²

Le cellule staminali tumorali sono simili alle cellule staminali normali ma hanno una serie di caratteristiche aggiuntive: la **disorganizzazione** strutturale, la **neoangiogenesi**, la capacità di invasione metastatica e la resistenza all'apoptosi. All'interno della popolazione tumorale, la divisione cellulare è guidata da eventi intracellulari, con minore dipendenza da stimoli esterni e microambientali.³⁵

Secondo la definizione consensuale dell'American Association for Cancer Research (AACR), una cellula staminale tumorale è una cellula con capacità di self renewal e multilineage differentiation.⁴⁶

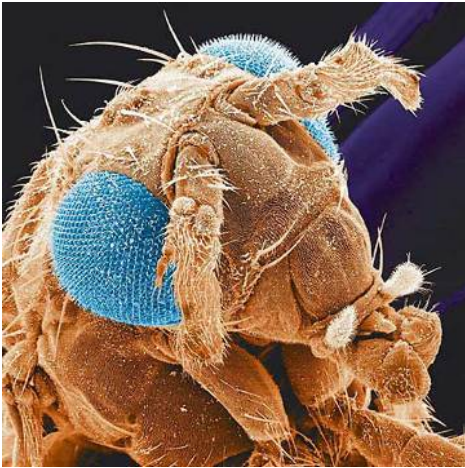
Se il cancro è una disregolazione delle cellule staminali che provoca proliferazione incontrollata, saranno i geni ed i pathways intracellulari che controllano il ciclo cellulare, l'abilità di self renewal, la replicazione e l'apoptosi ad essere vittima di mutazioni necessarie alla cancerogenesi (vedi Tab.1)^{42, 47-56}

Pathway	Normal stem cells	Cancer
Bmi-1	Bmi-1 is required for self-renewal of hematopoietic and neural stem cells	Bmi-1 is upregulated in AML and overexpressed in medulloblastoma
	Bmi-1 downregulates the Ink4a/Arf locus	Overexpressed Bmi-1 and cell proliferation induce self-renewal of leukemic stem cells
Shh	Involved in the maintenance of hematopoietic stem cells and expansion of progenitors	Activation of SHH is implicated in skin and brain carcinogenesis, including basal cell carcinoma of skin and medulloblastoma
	Crucial in embryonic development of skin, hair follicle, and sebaceous gland	Mutation of SHH causes Gorlin's syndrome
	Involved in postnatal and adult brain development	
Wnt/ β -catenin	Involved in the maintenance and self-renewal of hematopoietic stem cells and progenitor cells	Overexpression of WNT is seen in many human cancers
	Regulates the maintenance of normal intestinal epithelial cells	Accumulation of β -catenin is associated with breast cancer, melanoma, sarcoma, myeloid leukemia, multiple myeloma, and brain tumors
	Implicated in regenerative responses during tissue repair	Mutations in β -catenin are found in endometrial carcinomas, prostate carcinoma, and hepatocellular carcinomas
		Mutations of both β -catenin and APC genes are common in colorectal cancer
Notch	Mediates the self-renewal of hematopoietic and neural stem cells	Mutations or aberrant activation of Notch1 are known to cause T-ALL in human and mouse
	Activates Notch target genes involved in T cell differentiation and self-renewal	
Hox family	Involved in the self-renewal of hematopoietic stem cells and the proliferation and differentiation of precursor cells	Overexpression of HOXA9 is found in AML patients with poor prognosis
		Overexpression of HOX11 is described in T-ALL with chromosome translocations
		Hoxb3, Hoxb8, and Hoxa10 are associated with leukemogenesis in a mouse model
Pten	Implicated in the maintenance of hematopoietic stem cells and neural stem cells	Loss of PTEN leads to the formation of a variety of tumors, including myeloproliferative disease, and the emergence of transplantable leukemia
		Mutation and/or LOH cause glioblastoma multiforme, prostate carcinoma, and endometrial carcinoma
Efflux transporters	Marker proteins are found in self-renewing stem cells, such as ABCG family proteins, responsible for the side-population phenotype	Upregulated ABCG2, ABCB1, and CEACAM6 are found in cancer cells from the gastrointestinal system
		Upregulated ABCG is implicated in broad-spectrum chemoresistance of cancer cells, such as AML cells
Telomerase	Expressed at a high level in normal self-renewing populations in the blood	Expressed at a high level in tumor cell populations with upregulated mRNA expression
		hTERT is involved in tumorigenic transformation
		Upregulated telomerase activity is found in glioblastoma

Tab.1. Pathways intracellulari comuni tra cellule staminali e cellule staminali tumorali da Lobo et al The biology of cancer stem cells Annu Rev Cell Dev Biol. 2007;23:675-99⁴²

^aAbbreviations used: AML: acute myeloid leukemia; APC: adenomatous polyposis coli; hTERT: human telomerase reverse transcriptase; LOH: loss of heterogeneity; PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10; Shh/SHH: sonic hedgehog; T-ALL: T cell acute lymphoblastic leukemia; WNT: Wingless-Int.

Le capacità autorigenerativa di divisione simmetrica delle cellule staminali conferisce alle stesse una plasticità di sviluppo, di crescita ma allo stesso tempo costituisce un rischio allo sviluppo di cancro.



Le neoplasie sarebbero organizzate gerarchicamente in popolazioni clonali di cellule con differente potenziale proliferativo e con differente fenotipo, come avveniva per le cellule staminali.¹

A supporto di questa teoria si noti come i meccanismi che promuovono la divisione asimmetrica abbiano in ruolo chiave nella soppressione tumorale.

Ad esempio il gene APC (adenomatous polyposis coli) necessario per la divisione asimmetrica dei gameti della *Drosophyla* e probabilmente coinvolto nella divisione asimmetrica dell'epitelio intestinale umano, è anche un importante oncosoppressore nell'epitelio intestinale umano ed è uno dei primi geni mutati nella trasformazione neoplastica nel cancro coloretale.^{19,57-60}

La relazione tra divisioni simmetriche e cancro è stata anche supportata dall'osservazione che alcuni geni coinvolti nel meccanismo della divisione simmetrica funzionano come oncogeni nei mammiferi.⁶¹⁻⁶³

Come detto sopra, le cellule staminali multipotenti di un organismo adulto sono presenti in ciascun tessuto e sono organo e tessuto specifiche, rappresentano solo una minima parte della popolazione cellulare totale e possono proliferare durante tutta la vita dell'organismo di appartenenza; in condizioni normali la proliferazione è ridotta serve a mantenere il ricambio cellulare del tessuto ma può aumentare esponenzialmente in seguito ad un insulto per ripopolare il tessuto danneggiato.

Similarmente, anche la popolazione staminale di cellule tumorali varia ampiamente tra tessuto e tessuto, tra i sottotipi tumorali e tra gli individui.⁶⁴⁻⁶⁵

Di recente è stato ipotizzato che la percentuale della popolazione di CST dipenda dal tessuto di origine, dal microambiente stromale, dalle modificazioni somatiche accumulate e dallo stadio di malignità raggiunto dal tumore.^{43, 66}

Ultimamente, è stato riportato che la porzione di cellule staminali tumorali possa raggiungere fino al 25% della popolazione totale del tumore, sebbene percentuali discordanti esistano in letteratura^{32, 66}

Se i tumori sono malattie delle cellule staminali, e se esistono le cellule staminali tumorali, la domanda pertanto è: da dove derivano?

1.3 ORIGINE DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI

Le ipotesi sono essenzialmente due: da una cellula staminale normale che subisce modificazioni genetiche ma che già possiede capacità rigenerative e di differenziazione oppure da una cellula differenziata che tramite mutazioni acquisisce potenzialità staminali e successivamente va incontro ad espansione clonale (Vedi Fig.6).^{35, 67-8}

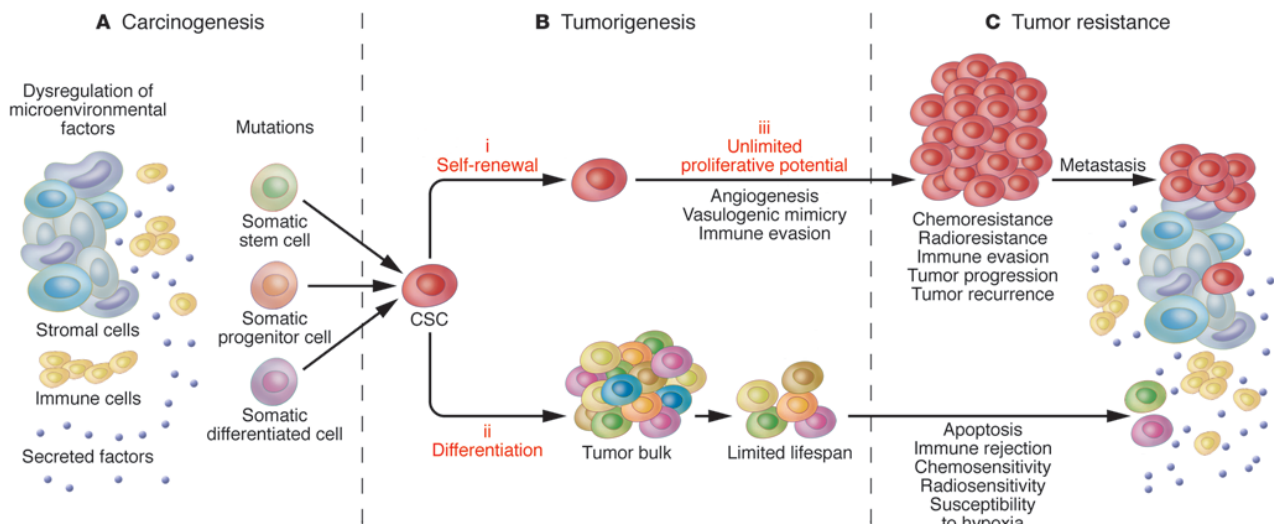


Fig 6 Possibili percorsi di carcinogenesi e metastatizzazione da Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. J Clin Invest. 2010; 120:41–50 ⁶⁷

L'ipotesi che il cancro derivi da una cellula staminale mutata sembrerebbe più semplice intuitivamente perché sarebbero necessarie meno mutazioni per mantenere la capacità rigenerativa invece che acquisirla de novo e tale teoria sarebbe supportata dalle seguenti osservazioni per i tumori del colonretto: ⁶⁸⁻⁶⁹

- 1) l'ontogenesi coloretale e la carcinogenesi producono architetture strutturali morfologicamente simili come le strutture ghiandolari;
- 2) i markers dell'ontogenesi sono trovati nelle cellule tumorali ma non nelle cellule terminalmente differenziate dell'epitelio intestinale (i.e. citocheratina CK20, β catenina);
- 3) i geni regolatori dell'ontogenesi sono iperespressi nelle neoplasie intestinali (Sonic, Notch, Wnt, ecc.).

Come una cellula staminale normale si divide simmetricamente dando vita ad una cellula progenitrice e ad una **transit amplifying cell** (TAC) che poi produrrà cellule differenziate, così una cellula staminale tumorale (CST), resa tale da mutazioni genetiche

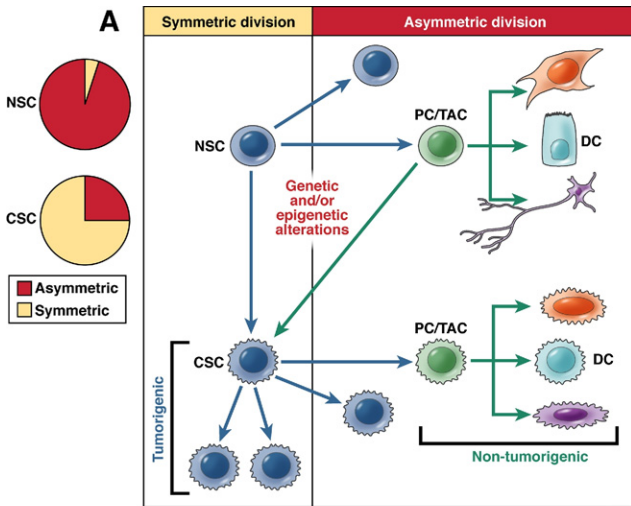
ed epigenetiche, si dividerà simmetricamente ed asimmetricamente producendo una popolazione mista di cellule progenitrici e TAC, sia tumorigeniche che non tumorigeniche.

Ed è per questo che la progenie di una CST è eterogenea, per genotipo e fenotipo, ma

anche per potenziale proliferativo e tumorigenicità *in vitro* ed *in vivo* (vedi Fig. 7)

67, 70-72

Fig. 7 Modalità di divisione delle cellule staminali tumorali da Todaro et al Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. Gastroenterology. 2010 Jun;138(6):2151 ²⁷



A confermare la diversità di queste cellule staminali tumorali dal resto della popolazione neoplastica è l'osservazione che piccole quantità di cellule tumorali disseminate nell'organismo sono presenti in pazienti che non sviluppano mai metastasi.⁷³⁻⁴

Una possibile spiegazione sarebbe che il sistema immunitario è in grado di eliminarle selettivamente oppure potrebbe significare che non tutte le cellule tumorali hanno potenziale rigenerativo e che è necessario che siano cellule con caratteristiche staminali a dover migrare in altri tessuti per formare metastasi (vedi Fig.6 e 8).⁷⁵

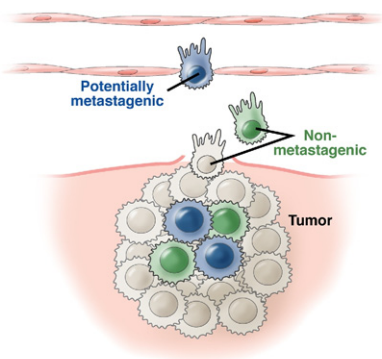


Fig. 8 Cellule metastatigene da Todaro et al Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. Gastroenterology 2010 Jun;138(6):2151 ²⁷

Attualmente molti dei maggiori esperti di cellule staminali sono propensi ad avallare una teoria che contenga parzialmente sia il modello staminale gerarchico sia quello stocastico, a giustificare la grande eterogeneità dei tumori ed a dimostrazione dell'importanza del microambiente sul fenotipo delle cellule staminali tumorali.^{2, 76-7}

Il modello di evoluzione clonale potrebbe applicarsi infatti ad una cellula staminale (o ad una cellula differenziata che riacquista il potenziale di self renewal) che diventa tumorale in seguito a modificazioni genetiche ed epigenetiche. Queste mutazioni le conferiscono un beneficio selettivo, ad esempio di crescita, e questa cellula potrebbe andare incontro ad espansione clonale fino a prevalere sul resto delle altre cellule non tumorali.

Le differenze tra i due modelli di tumorigenesi sono illustrate in Fig.9.⁷⁸

	Cancer Stem Cell Model	(Stochastic) Clonal Evolution Model ^a
Frequency of cancer cells with tumorigenic potential	Rare to moderate	High
Phenotype of cancer cells	Heterogeneous	Heterogeneous or homogeneous
Tumor organization	Hierarchical	Not necessarily hierarchical
Intrinsic differences between tumorigenic and nontumorigenic cells	Stable, epigenetic	Unstable, epigenetic or genetic
Rational approach to therapy	Possible to target only tumorigenic cells	Target most or all cells
Compelling clinical evidence	Germ lineage cancers	High-grade B cell lymphoblastic leukemia ^b

Fig.9.Differenze tra i modelli di tumorigenesi da Shackleton et al Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. Cell. 2009 Sep 4;138(5):822-9.⁷⁸

Questa scoperta ha enormi **implicazioni terapeutiche**.

Se è vero che le cellule staminali tumorali sarebbero responsabili della proliferazione tumorale nonché delle metastasi questo spiegherebbe il fallimento delle chemioterapie convenzionali capaci di diminuire la massa tumorale ma solo transitoriamente. Gli effetti di queste terapie non modificano il corso della malattia né la sopravvivenza globale dei pazienti non essendo capaci di eradicare le metastasi.^{67, 79-81}

Per curare efficacemente una neoplasia, è necessario dirigere le terapie anche contro quello specifico set di cellule che sono le principali responsabili del mantenimento della

neoplasia, della comparsa di recidive e metastasi e che, notoriamente, sono più resistenti delle cellule differenziate alle chemioterapie (vedi Fig.10).⁸²

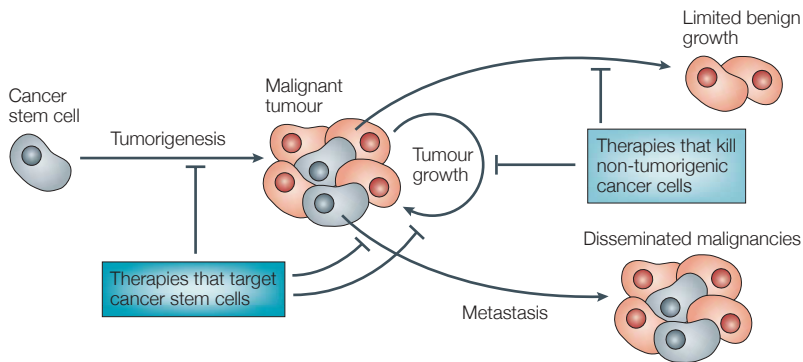


Fig.10 Implicazioni terapeutiche delle cellule staminali tumorali da Pardal R et al. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. Nat. Rev. Cancer 2003; 3: 895–90¹

Le ragioni per questa maggiore resistenza possono essere dovute a diversi fattori, per esempio l'iperpressione di geni anti-apoptotici o di geni che conferiscono *multidrug resistance* o per la maggior capacità di riparare i difetti di DNA rispetto alle cellule normali.^{55, 82-85}

1.4 IDENTIFICAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI (CST)

Secondo la definizione dell'AACR, affinché una cellula sia definita staminale tumorale deve essere in grado di riprodurre un tumore di simili caratteristiche a quello originale se trapiantata anche dopo molteplici cicli e deve essere capace di originare cellule non staminali, cioè differenziate.

Per isolare le CST si sono utilizzate progressive diluizioni in vitro su saggi di immunostochimica con anticorpi monoclonali atti ad identificare le molecole (**markers** di superficie) indice di "staminalità" allo scopo di evidenziare quale fosse la minima

concentrazione cellulare di CST in grado di riprodurre tumore se ritrapiantata in topi NOD/SCID (*non obese diabetic/severely combined immunodeficient*). Questa particolare specie di topi è usata spesso in esperimenti di xenotrapianto poiché priva di linfociti B o T funzionanti quindi incapace di rigettare il *graft*).

In particolare, la popolazione neoplastica prelevata da tumori noti o da linee cellulari tumorali in commercio veniva disaggregata e testata per i markers ricercati per selezionare una popolazione con le caratteristiche ipotizzate, cioè di staminalità.

Molteplici i markers studiati, tra cui ricordiamo CD 44, CD 166, CD 133, LgR5, ALDH1 ecc. Successivamente per verificare il potenziale staminale di quella popolazione, le cellule selezionate venivano trapiantate in maniera seriale nel modello animale, di solito topi NOD/SCID. Questo metodo sebbene imperfetto rappresenta a tutt'oggi il gold standard degli esperimenti funzionali per confermare questa caratteristica.⁸⁶

Altri metodi di identificazione delle CST includono la caratterizzazione morfologica, ad esempio l'identificazione di *bell-shaped* nuclei e della loro posizione nelle cripte⁸⁷, e pattern di metilazione del DNA e proteine RNA binding.^{24,88-9}

L'esistenza delle CST (cellule staminali tumorali) fu identificata inizialmente nelle cellule del sistema ematopoietico, nel linfoma e nella **leucemia mieloide acuta** (LMA).^{70,90}

In seguito attraverso l'utilizzo di markers di superficie (CD44/CD38); le cellule ritenute CST furono isolate e trapiantate in ratti NOD/SCID che svilupparono una LMA simile a quella d'origine, mentre le altre cellule tumorali di LMA CD44-/CD38- non avevano la capacità di generare lo stesso tumore nell'animale trapiantato, caratteristica fondamentale per rientrare nella categoria di CST secondo la definizione dell'AACR.^{64,91}

Grazie all'utilizzo di markers di superficie, CST furono evidenziate anche per i tumori solidi: carcinoma mammario, retinoblastoma, teratocarcinoma, carcinoma prostatico, epatocarcinoma, neuroblastomi/gliomi/glioblastomi, il melanoma (Vedi Fig.11)⁹²⁻⁸ ed il carcinoma colorettaie (CRC).⁹⁹⁻¹⁰³

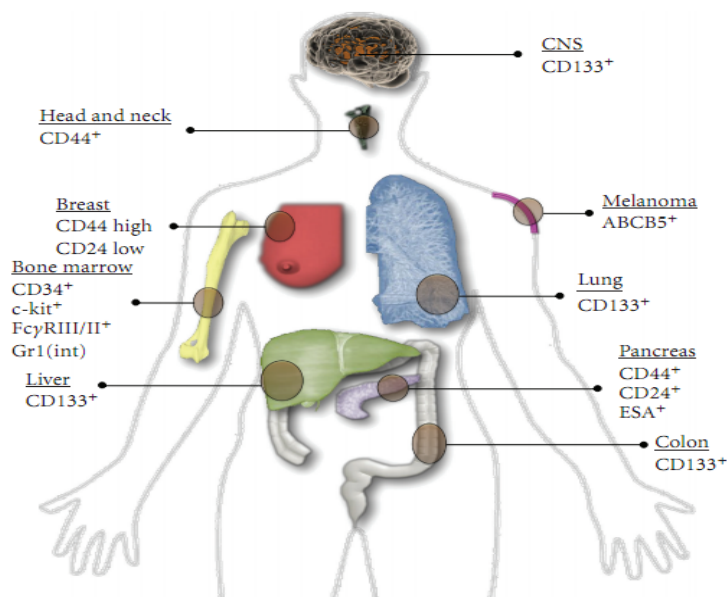


Fig. 11: Markers cellulari di CST per vari tipi di tumori Da Morrison R et Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol.* 2011;2011:941876.¹⁰³

Non è ancora chiaro se i markers abbiano lo stesso significato in tutti i tessuti o in tutti i tipi di tumori. È più probabile infatti che l'espressione di queste molecole sia legata a numerosi fattori e non solo allo stadio differenziativo cellulare, come si è notato dall'eterogeneità dei risultati ottenuti in esperimenti simili su tumori differenti.

L'individuazione delle CST apre nuovi orizzonti terapeutici, che includono non solo agenti chemioterapici ma anche immunoterapie ed agenti che inducono la differenziazione cellulare (sensibilizzanti quindi ai chemioterapici) e ci avvicina al concetto di terapia *ad hoc* specifica per ogni paziente in base alla caratterizzazione biomolecolare di ogni

specifico tumore, strada che conduce alla definitiva eradicazione della malattia (Vedi Fig.12).

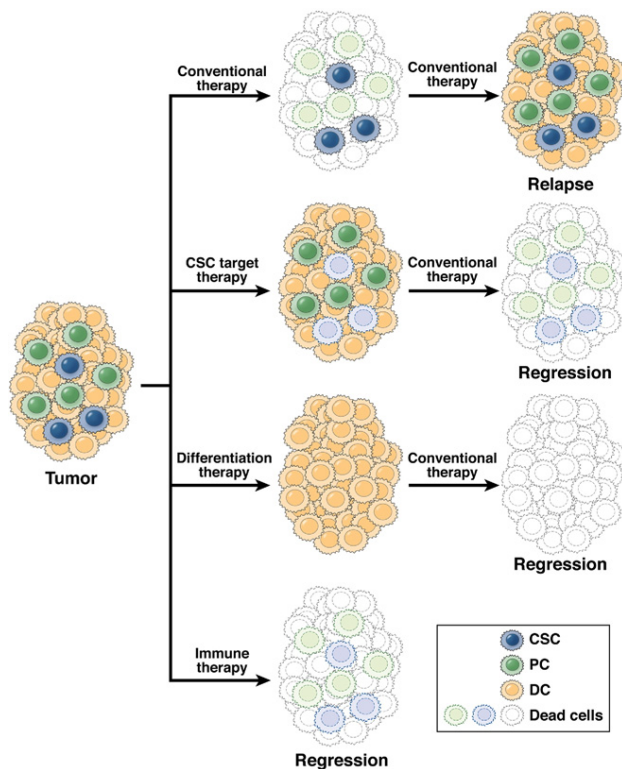


Fig.12 Approcci terapeutici al cancro da Todaro M et al Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. Gastroenterology. 2010 Jun;138(6):2151-62²⁷

1.5 IL CD133

Il CD133, o Prominina, esistente in 3 isoforme, è una glicoproteina di superficie (proteina transmembrana) di cui la reale funzione e i cui ligandi sono ancora prevalentemente ignoti.¹⁰⁴

La sua espressione è stata osservata nelle protrusioni della membrana plasmatica, tipicamente nei microvilli e nelle stereociglia dell'epitelio duttale dell'epididimo da qui prominina (dal latino *prominere* = sporgere); è stata associata anche al trasporto di vescicole e questa peculiarità è mantenuta in diverse specie (vedi Fig. 13).¹⁰⁵

Data la sua posizione nelle protrusioni della membrana cellulare e la sua abilità nell'interagire con il colesterolo di membrana, si ipotizzò un ruolo nella polarità cellulare, nella migrazione cellulare e nella organizzazione/modulazione della topologia della membrana cellulare stessa.¹⁰⁶⁻¹¹⁰

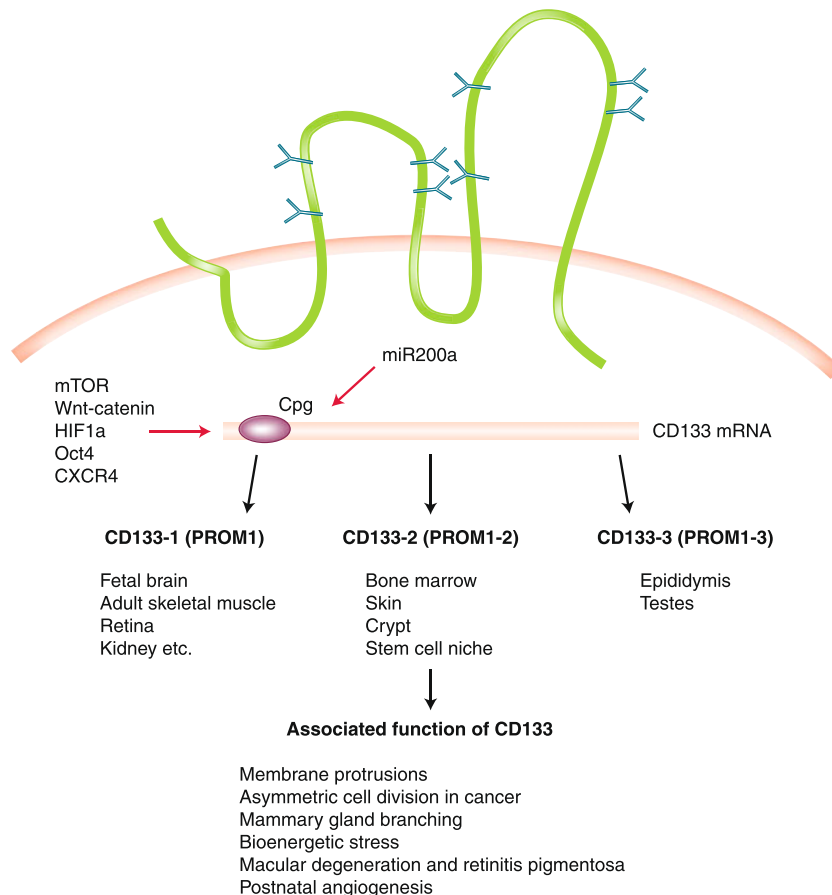


Fig. 13 Struttura e localizzazione delle prominine da Yu X et al CD133, Stem Cells, and Cancer Stem Cells: Myth or Reality? *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2011 Dec;7(4):253-259.¹⁰⁵

Il CD133 venne evidenziato come marker delle CST inizialmente in neoplasie del sistema nervoso e successivamente in molte altre neoplasie, tra cui epatiche, pancreatiche, renali, prostatiche, melanoma, ovarico e polmonare.^{2,67,96,105}

Nel 1997 fu introdotto da Yin et al un nuovo anticorpo monoclonale che riconosceva l'antigene AC133, un epitopo glicosilato di CD133 (epitopo: parte dell'antigene che si lega all'anticorpo). L'espressione di questo antigene era ristretta alle cellule progenitrici CD34+

proveniente dal sangue di esseri umani adulti, dal midollo osseo e dal fegato fetale suggerendo il ruolo di CD133 come marcatore di cellule staminali del sistema ematopoietico.¹¹¹ Altri anticorpo spesso usato per identificare il CD133 è il 293C/AC141 che sembra riconoscere un epitopo diverso rispetto ad AC133.¹¹²

La sua espressione subisce una regolazione epigenetica in seguito a stimoli del microambiente o indotti da radiochemioterapia (RCT).

Per studiare le caratteristiche di una popolazione CD133 bisogna essere certi di conoscere come varia la struttura di questa molecola in diverse condizioni di differenziazione, ambiente circostante ed accertarsi che i mezzi utilizzati per selezionarla siano adeguati per ridurre al minimo numero di falsi positivi o falsi negativi.

Analisi critica di queste problematiche è proposta più avanti.

Una mutazione del gene di prominina1 provocava retinite pigmentosa, degenerazione maculare e distrofia in pazienti umani, dovute probabilmente a disfunzione endoteliale che provocava diminuita capacità di adesione e alti livelli di danno cellulare.

Alcuni esperimenti dimostrarono la capacità rigenerativa e la plasticità di cellule CD133 + che trapiantate in ratti NOD/SCID erano in grado di migliorare il quadro distrofico dell'animale attraverso la diretta rigenerazione muscolare.¹¹³

1.6 CD133 COME MARKER DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI

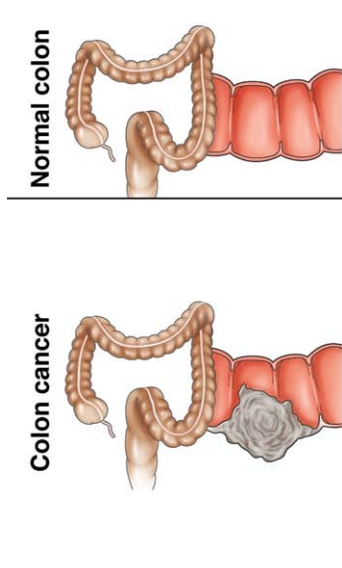
Il CD133 è stato isolato ampiamente in cellule staminali sia normali che tumorali ed è usato come marker della divisione asimmetrica, della plasticità staminale, della quiescenza delle cellule tumorali; è stato inoltre associato ad una serie di importanti regolatori e pathways intracellulari importanti per le cellule staminali tumorali.¹¹⁴⁻¹²⁰

Il CD133 è stato identificato come promettente markers di CSC in altri tessuti (soprattutto in neoplasia di origine epiteliale), tra cui quello renale, quello nervoso, quello epatico, quello pancreatico e prostatico.¹²¹⁻¹³⁴

Il CD133 venne anche identificato in nicchie di cellule staminali marcate dalla co-espressione delle β integrine nella lamina basale dell'epidermide del neonato: la perdita della sue espressione era associata con la differenziazione terminale delle cellule.¹³⁷

1.7 MARKER DELLE CST NEL CANCRO DEL COLONRETTO e CD133

Diverse sono le molecole studiate come markers di cellule staminali normali o tumorali nei tumori del colonretto (vedi Fig.14).¹³⁸



Marker	Other name	Function	References
Msi-1		RNA-binding protein	29
CD29	Integrin b1	Cell adhesion molecule	35
Lgr5	GPR49	Unknown, Wnt target gene	36
DCAMKL-1		Kinase	38
CD133	Prominin 1	Self-renewal, Tumor angiogenesis	70, 71 72, 75
ESA	EpCAM, BerEp4	Cell adhesion molecule	79
CD44	CDW44	Cell adhesion molecule, Hyaluronic acid receptor	79, 81, 82
CD166	ALCAM	Cell adhesion molecule	79, 81
Msi-1		RNA-binding protein	80
CD29	Integrin b1	Cell adhesion molecule	81
CD24	HSA	Cell adhesion molecule	81
Lgr5	GPR49	Unknown, Wnt target gene	81
ALDH1	ALDC	Enzyme	87

Fig.14 Markers di cellule staminali e CST nel colonretto da Todaro M et al Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. Gastroenterology. 2010 Jun;138(6):2151-62²⁷

Negli studi sul cancro del colon retto (CRC) si ipotizza che CD133 fosse un marker delle CST perché le cellule che lo esprimevano erano prevalentemente localizzate sul versante endoluminale delle cripte ghiandolare, dove risiedono le cellule staminali.^{99,119,120,139-141}

A riprova del fatto che CD133 non fosse presente su cellule differenziate, le popolazioni CD133+ tipicamente non esprimevano **CK20**, una citocheratina tipicamente presente sulla superficie delle cellule epiteliali intestinali terminalmente differenziate; tali dati tuttavia non sono stati uniformemente confermati in altri studi, fenomeno che potrebbe suggerire che la staminalità non è necessariamente presente o assente, ma potrebbe essere una caratteristica che scompare gradualmente.^{100,119} La perdita di CK20 era anche osservata nella popolazione CD133+ di cellule tumorali di recidiva in pazienti affetti da cancro del retto sottoposti a RCT preoperatoria e chirurgia radicale.¹⁴²

Tre sono gli studi chiave che hanno dimostrato il ruolo di CD133 come marker delle cellula staminale tumorale nel cancro del colon retto.

Nei primi due lavori di O'Brien⁹⁹ e Ricci¹⁰⁰, il CD133 fu utilizzato per identificare cellule con potenziale tumorigenico. O'Brien⁹⁹ et al isolarono cellule da 7 tumori colici primitivi e 9 metastasi e dimostrarono che solo le cellule CD133 + erano in grado di iniziare tumori se trapiantate nella capsula renale di topi NOD/SCID e che le neoplasie riprodotte avevano caratteristiche simili a quella d'origine. La percentuale di positività al CD133 era da 3.2 a 24.5% della massa tumorale, mentre nel tessuto sano era di 0.4-2.1%.

Nello studio di Ricci si osservò che le cellule di tumori del colon retto in vitro avevano capacità di formazione di "sfere tumorali" CK20 negative e che queste colonie erano arricchite da cellule CD133+. Solo la popolazione CD133+ era tumorigenica mentre cellule CD133 - non erano in grado, nemmeno in alte quantità, di riprodurre la neoplasia originale se trapiantate nel topo NOD/SCID. Inoltre, solo cellule CD133+ potevano creare una progenie tumorale eterogenea (CD133+ e -), dimostrando la capacità di multilineage differentiation, mantenuta in xenotrapianti in serie.

Nel terzo studio, Dalerba et al¹⁰¹ evidenziarono il fenotipo delle cellule staminali tumorali nel colonretto utilizzando CD44, EpCam e CD133. Il CD44 risultò però il marker più specifico delle CST nel CRC, poiché evidenziava la popolazione di cellule staminali anche in caso di CD133 negatività ed inoltre anche all'interno della popolazione CD133+ riusciva a discriminare la porzione di cellule arricchita di maggior potenziale staminale.

Li et al¹⁴³ hanno dimostrato che linee cellulari di carcinoma del colonretto umano CD133+ possono produrre tumori più efficacemente che linee CD133- ed inoltre esprimono un fenotipo più aggressivo, in termini di formazione di metastasi; pertanto il CD133 in questo ultimo studio è stato identificato come marker di maggiore tumorigenicità ed aggressività.

Altro studio a supporto della potenzialità di CD133 di selezionare CST è quello di Vermeulen et al ¹¹⁷ dove solo linee CD133+ erano in grado di esprimere una progenie multidifferenziata ed erano capaci di riprodurre una neoplasia in vivo.

1.8 VALORE PROGNOSTICO DEL CD133 NEL CRC

Se le CST sono responsabili della comparsa di recidiva, metastasi e della chemio-radioresistenza, è essenziale individuare marker sempre più specifici per identificarle.

Tumori più ricchi di CST avranno intuitivamente prognosi peggiori, con sopravvivenze globali e libere da malattia inferiori.

In particolare per evidenziare il ruolo di CD133 come marker delle CST e quindi come fattore prognostico, diversi gruppi hanno studiato la correlazione tra la sua espressione nelle popolazioni tumorali e parametri clinico-patologici quali la sopravvivenza, la comparsa di recidiva di malattia e le metastasi in una serie di tumori. Alta prevalenza di CD133+ è stata associata prognosi scarsa in una serie di tumori solidi, quali stomaco, endometrio, cervello, fegato, ovaio, polmone e colon retto (vedi Fig.15). ^{2,67,96,105}

Tumor type	CD133 protein high expression		CD133 mRNA high level	
	Short survival	Relapse	Short survival	Relapse
Colorectal cancer	Yes	Yes	Yes	Yes
Ovarian	Yes	Yes	NA	NA
Stomach	Yes	Yes	NA	NA
Liver	Yes	Indeterminate	NA	NA
Lung	Yes	Yes	NA	NA
Brain	Yes	Yes	Yes	Yes

Fig.15 Correlazione tra CD133 e prognosi tumorale da Yu X et al CD133, Stem Cells, and Cancer Stem Cells: Myth or Reality? Curr Colorectal Cancer Rep. 2011 Dec;7(4):253-259¹⁰⁵

Inoltre neoplasie ad alta espressività di CD133 erano più frequentemente radio o chemioresistenti. ^{142, 144-148}

Che significato avrebbe identificare con certezza il CD133 come marker delle CST nel CRC, confermandolo come fattore prognostico per la comparsa di recidiva e di metastasi nonché marcatore di popolazioni radiochemioresistenti?

- 1) sarebbe possibile identificare precocemente la popolazione di pazienti più a rischio e trattarli tempestivamente o sottoporli a programmi di follow up più rigidi;
- 2) terapie mirate verso le cellule che lo esprimono potrebbero di fatto fornire una cura a lungo termine in una delle neoplasie che rimane responsabile del più alto numero di morti per cancro nel mondo occidentale.

I fattori prognostici nel CRC finora evidenziati sono principalmente: l'invasione locale, linfonodale e vascolare del tumore, la presenza di metastasi peritoneali o a distanza, la presentazione d'urgenza (in seguito ad occlusione o perforazione) ed il grado istologico.

Lo studio di Horst ¹¹⁹ è stato il primo a dimostrare che tumori ad alta CD133 + (intesa come positività al CD133 di più del 50% delle strutture ghiandolari tumorali) sono associati ad un outcome peggiore. I dati sono confermati alla regressione di Cox. È importante notare come la positività sia stata studiata con 3 diversi anticorpi per minimizzare gli errori di identificazione.

In questo studio, si è notato che la positività al CD133 è tipicamente nella superficie endoluminale delle strutture pseudoghiandolari tumorali, dove verosimilmente risiedono le cellule con caratteristiche di staminalità. Non si è riscontrata positività citoplasmatica,

invece riportata in altri tipi di neoplasia (pancreatica), differenza che indica come la localizzazione sia dipendente dalla tipologia del tumore e l'espressione di CD133 assuma significati diversi conseguentemente.¹⁴⁹⁻¹⁵⁰

Horst suggerisce come la positività al CD133 indichi una popolazione tumorale con caratteristiche di staminalità ma come all'interno di questo gruppo le CST responsabili della crescita neoplastica siano una minoranza (1/262 secondo O'Brien et al) ed al momento non esistono marker veramente specifici per caratterizzarle selettivamente.

In uno studio di Kojima et al¹⁴¹ su 155 pazienti sottoposti a resezione radicale per neoplasia del CRC si è osservato che nei tumori ben o moderatamente differenziati l'alta espressione di CD133+ era associata ad una prognosi peggiore, anche se il CD133 non si è confermato fattore prognostico indipendente nell'analisi multivariata.

Invece, nello studio di Choi et al¹⁵¹ su 524 pazienti affetti da cancro coloretale sebbene la positività al CD133 fosse associata a stadi più avanzati di tumore, questa correlazione non era statisticamente significativa.

CD133+ in cellule di sangue periferico

Anche la presenza di cellule tumorali circolanti nel sangue periferico si è dimostrata utile come fattore prognostico per la sopravvivenza, ma i metodi utilizzati per la sua identificazione non si sono dimostrati abbastanza sensibili. Inoltre come noto non tutte le cellule circolanti sono capaci di iniziare metastasi.

Lin et al¹⁵² hanno studiato la presenza di mRNA di CD133 circolante nel sangue periferico di pazienti affetti da CRC dimostrando che esiste una correlazione tra livelli di CEA ed il CD133 mRNA in termini prognostici: la combinazione dei 2 markers era associata ad un

outcome peggiore. L'mRNA di CD133 era il fattore prognostico principale predittivo di recidiva indipendentemente dallo stadio TNM e dai livelli CEA.

Queste osservazioni erano in linea con altri studi:

- Mehra et al in cui alti livelli di mRNA di CD133 nel sangue periferico erano associati a presenza di metastasi (specialmente ossee) ed erano correlati con una sopravvivenza inferiore;¹⁵³

- Iinuma¹⁵⁴⁻⁵ in cui il CD133 mRNA nel sangue periferico di pazienti affetti CRC stadio Dukes B e C, se combinato con CK e CEA, era il principale fattore prognostico per la sopravvivenza globale e libera da malattia, all'analisi uni e multivariata

il CD133 nel lavaggio peritoneale

La citologia su lavaggio peritoneale di pazienti affetti da CRC non viene utilizzata di routine come fattore prognostico perché è considerata una metodica troppo poco sensibile. Sono stati descritti casi di pazienti con disseminazione peritoneale di malattia e citologia negativa.¹⁵⁶

Nakamura et al hanno dimostrato però che con metodi di RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) l'identificazione combinata di CD133/CEA/CK20 nel lavaggio peritoneale è un fattore prognostico significativo per la sopravvivenza libera da malattia e globale.¹⁵⁷

1.9 CD133 E RESISTENZA A CHEMIORADIOTERAPIA

Numerosi studi indicano che le cellule staminali tumorali sono chemioradioresistenti e sono preferenzialmente preservate da queste terapie che ucciderebbero la maggior parte delle cellule che di fatto non hanno grande potenziale di crescita tumorale. ¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

Le ragioni della maggiore resistenza nelle CST ed i risultati di questi studi verranno analizzati più avanti.

Alle CST resistenti sarebbero imputate l'insorgenza di recidive e metastasi. E' intuitiva la necessità crescente di identificare queste CST ed aggredirle con farmaci specifici.

Il CD133 è stato proposto come marker di questa popolazione cellulare di CST, sia singolarmente che in associazione con altri markers, perché si è osservata la sua alta espressività in popolazioni resistenti alle chemioradioterapia ed essendo stato identificato come fattore prognostico negativo per la sopravvivenza globale e libera da recidiva nel CRC ed in altri tumori(glioblastoma, epatocarcinoma e tumore mammario) ^{126,147,159,161-4}

Il CD133 è stato associato a pazienti resistenti alla chemioterapia con 5FU o radioterapia.

In uno studio di Dallas et al popolazioni ricche di CD133+ rispondevano meno alla chemioterapia con 5FU ed oxaliplatino ed erano associate a prognosi peggiori. ¹⁶⁵

Saigusa et al ¹⁴² hanno osservato che i pazienti che sviluppavano recidiva dopo radioterapia preoperatoria e chirurgia radicale per cancro del retto avevano significativamente più cellule CD133+ (CD133/OCT4/SOX2) se paragonati ai pazienti che non recidivavano.

Ong et al ¹³⁹ hanno osservato su 501 campioni di CRC come tumori ad alta espressività di CD133 (che costituiva il 27% dei tumori esaminati), dopo chirurgia e chemioterapia

adiuvante, erano associati a prognosi peggiore. Le popolazioni CD133- avevano un maggiore beneficio di sopravvivenza dalla chemioterapia con 5FU: il 75% di queste ultime aveva risposto al trattamento, contro il 29% delle CD133+.

In uno studio di Wang¹⁴⁰ et al si è dimostrato che popolazioni ricche di cellule CD133+ (definite da una positività > 10%) erano associate a moderata o scarsa differenziazione, invasione linfovaskolare, stadio T avanzato e scarsa regressione tumorale dopo radioterapia preoperatoria in pazienti affetti da cancro del retto, nonché scarsa sopravvivenza globale e libera da malattia.

Nello stesso studio è stato notato che in neoplasie con alta espressione di CD133+(CD133^{high}), la sopravvivenza era indipendente dallo stadio TNM, mentre in popolazioni CD133^{low} lo stadio TNM diventava il fattore prognostico principale.

Questa è un'osservazione di grande importanza clinico-terapeutica.

Se consideriamo che una stadiazione appropriata dei pazienti con tumore coloretale richiede il prelievo/analisi di almeno 12 linfonodi dal campione operatorio, si incorre nel fenomeno della *stage migration* se questo numero non viene raggiunto. Questo provoca la scorretta stadiazione di pazienti, che diventa rischiosa nel momento in cui pazienti ad alto rischio di recidiva vengono sottostimati a basso rischio, non ricevendo quindi terapie adiuvanti.

Il CD133 si è dimostrato uno strumento sensibile nell'identificare questa popolazione, indipendentemente dal TNM.

Ancora non è chiaro se il CD133 sia semplicemente un marker delle cellule resistenti o se effettivamente contribuisca al meccanismo di resistenza.¹⁶⁶

1.10 LIMITI DEL CD133

Malgrado l'evidenza sopra presentata, sono stati pubblicati lavori che sostengono la non appropriatezza di CD133 come marker prognostico delle cellule staminali tumorali.

UBIQUITA' DI CD133

In diversi report le cellule positive per il CD133 erano più comuni nella massa tumorale che nel normale tessuto intestinale, dove erano scarse o assenti; questo dato non è stato confermato in recenti studi che hanno invece evidenziato l'ubiquità del CD133 sulle membrane cellulari di molteplici tipi cellulari.¹⁶⁷

Artelles et al¹⁶⁸ hanno osservato che la positività al CD133 era presente nel 93.7 % dei pazienti ma nell'88.8% dei casi sia nel tessuto normale che nella massa tumorale, pur essendo maggiore nell'area tumorale (nel 70% dei casi). I casi CD133+ sono stati divisi in alta e bassa positività e la maggior parte (75%) sono risultati a CD133+^{high}, in linea con altri report.^{119,151}

Shmelkov¹⁶⁹ ha identificato il CD133 negli epitelii differenziati di tutto il tratto gastrointestinale normale e tumorale, di topi ed umani, e non solo nel compartimento staminale. Ha messo in discussione l'utilità del CD133 come marker delle CST nel CRC dimostrando che anche popolazioni CD133 negative potevano sviluppare tumori e metastasi se trapiantate.

CD133 E TUMORIGENICITA' E MULTILINEAGE DIFFERENTIATION

Dittfeld et al¹⁷⁰ hanno esaminato linee cellulari di CRC in vitro ed in vivo, dimostrando che non vi era differenza di tumorigenicità o resistenza alla radioterapia tra linee CD133+ e

negative. Dato interessante, da una popolazione di cellule CD133 negative venne generata una colonia particolarmente ricca in CD133 dopo trapianto, dimostrando come la multilineage differentiation non fosse riservata alle CD133+.

Anche nello studio di Dalerba et al¹⁰¹ veniva confermata la capacità tumorigenica di popolazioni CD133- e la non selettività di CD133 come marker delle sole CST.

CD133 E SENSIBILITA' COME MARKER DELLE CST

Oltre agli autori sopra menzionati, anche il gruppo di Haraguchi¹⁷¹ ha espresso riserve sulla specificità di CD133 come marker delle CST. In uno studio su CD133/ALDH1, (l'enzima detossificante **aldeide deidrogenasi 1** che conferisce chemioresistenza agli agenti alchilanti in altri tumori 184) mise in evidenza come CD133+/ALDH1+ fosse fenotipo comune nelle cripte coliche iperplastiche sia in pazienti con poliposi familiare (FAP) ed in maniera ancora più marcata negli adenomi. Il potenziale tumorigenico in vivo si dimostrava ristretto al gruppo ALDH1+, all'interno della popolazione CD133 piuttosto che dipendente al CD133+.

Gli autori di questi studi summenzionati esprimevano riserve sul fatto che CD133 potesse essere utilizzato come marker selettivo delle cellule staminali tumorali.

Infatti è stata anche suggerita la non essenzialità di CD133 per mantenere lo status di cellula staminale, dimostrata dal fatto che il knockdown di CD133 in cellule tumorali del CRC non influenzava la migrazione, la capacità di invasione, la clonogenicità e la capacità tumorigenica.¹⁷²⁻³

1.11 IL NOSTRO STUDIO

In questo contesto di evidenze discordanti si inserisce il nostro studio, in cui abbiamo esaminato il valore di CD133 come marker prognostico nel cancro del colonretto in una serie di 26 pazienti affetti da CRC sottoposti a chirurgia resettiva presso il nostro Istituto nel periodo 1 gennaio 2003- 31 Dicembre 2003.

2. MATERIALI - METODI - RISULTATI

In questo studio presentiamo la nostra casistica di pazienti affetti da carcinoma coloretta sottoposti a resezione chirurgica nel periodo 1/1/2003-31/12/2003 presso la Clinica Chirurgia Generale e Trapianti d'Organo dell'Ospedale di Parma.

Dei 47 pazienti considerati, 7 sono stati esclusi perché i dati raccolti erano incompleti mentre 13 sono stati persi al follow up. I pazienti inclusi nello studio sono 26.

Tutte le neoplasie sono state considerate indipendenti dal grado istologico.

Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella Tab 2. 17 pazienti erano maschi e 9 erano femmine, con un'età media di 72.2 anni.

Tab 2: Caratteristiche dei pazienti.

n.pz	età	sesso	TNM	stadio
1	58	m	pT2 N0 M0	I
2	46	m	pT2 N0 M0	I
3	65	f	pT2 N1 M0	IIIA
4	54	m	pT2 N1 M0	IIIA
5	79	m	pT3 N0 M0	IIA
6	82	f	pT3 N0 M0	IIA
7	72	m	pT3 N0 M0	IIA
8	71	m	pT3 N0 M0	IIA
9	62	m	pT3 N0 M0	IIA
10	80	m	pT3 N0 M0	IIA
11	75	m	pT3 N0 M0	IIA
12	82	f	pT3 N0 M0	IIA
13	89	f	pT3 N1 M0	IIIB
14	76	m	pT3 N1 M0	IIIB
15	79	f	pT3 N1 M0	IIIB
16	72	m	pT3 N1 M0	IIIB
17	62	m	pT3 N1 M0	IIIB
18	70	f	pT3 N1 M1	IV
19	74	m	pT3 N1 M1	IV
20	82	m	pT3 N2 M0	IIIC
21	72	f	pT3 N2 M0	IIIC
22	78	m	pT3 N2 M0	IIIC
23	75	m	pT3 N2 M0	IIIC
24	78	m	pT4 N0 M0	IIB
25	75	f	pT4 N2 M0	IIIC
26	71	f	pT4 N2 M1	IV

Per quanto riguarda lo stadio TNM (sec. Classificazione dell'AJCC 1997¹⁷⁴): 2 erano stadio I, 8 stadio IIA, 1 IIB, 2 IIIA, 5 IIIB, 5 IIIC e 3 IV.

Campioni di tessuto tumorale sono stati prelevati da ciascun paziente previo consenso informato.

I campioni sono stati fissati in formalina ed inclusi in paraffina; sono state ottenute sezioni di 4 mm di spessore su vetrini silanizzati.

L'indagine immunohistochimica è stata eseguita utilizzando l'anticorpo monoclonale CD133/1 (clone AC133 – MAC, Miltenyi Biotec, Auburn CA 95602, USA).

La molecola è un antigene transmembrana di superficie del peso molecolare di 117 kD.

Il CD133/1 (clone AC133) riconosce l'epitopo 1 del CD133.

Dopo smascheramento antigenico (Dako retrieval solution pH9, cod. S2367) con tampone fosfato a pH 9, a bagnomaria a 95°C per 40 minuti, abbiamo usato il sistema avidina/biotina, con tecnica routinaria, e controcolorazione nucleare con ematossilina di Harris. La diluizione usata per l'impiego dell'anticorpo CD133/1 (AC133) è stata di 1:100.

Sono state effettuate quindi delle valutazioni semiquantitative delle indagini, prendendo in considerazione la percentuale di cellule tumorali positive e l'intensità dell'immunoreazione graduandola secondo una scala di intensità di 3 gradi: + debole intensità di membrana, ma completa; ++ intensità di membrana facilmente rilevabile anche a piccolo ingrandimento (10x); +++ intensità brillante facilmente rilevabile anche ai minimi ingrandimenti (4x).

Tali valutazioni sono state riferite in maniera semiquantitativa ai controlli positivi esterni usati: cellule staminali prostatiche, renali e fetali neurali, le cui immunocolorazioni erano brillanti e visibili anche a 4x.

La positività al CD133 è stata definita da una reattività istochimica della popolazione cellulare $<$ (negativa) o \geq al 50%(positiva).

Non è stato effettuato uno studio differenziato sulla localizzazione della positività (di membrana, citoplasmatica).

Le curve di sopravvivenza sono state eseguite secondo l'analisi di Kaplan-Meier ed i gruppi confrontati con il log rank test.

L'analisi statistica è stata fatta con SPSS (SPSS Inc. Chicago, IL USA), Student T test and χ^2 test sono stati utilizzati per analizzare le variabili continue e discontinue; una $p < 0.05$ è stata considerata statisticamente significativa.

I risultati ottenuti sono mostrati in tabella 3.

n. pz	positività' % CD133	intensità' della colorazione
1	> 50	++
2	> 50	++
3	> 50	+++
4	> 50	+
5	> 50	+++
6	> 50	++
7	> 50	+++
8	> 50	++
9	> 50	++
10	> 50	+++
11	< 50	+
12	> 50	++
13	> 50	++
14	> 50	+
15	> 50	+
16	> 50	+
17	> 50	+++
18	> 50	+++
19	> 50	+++
20	> 50	++
21	> 50	+++
22	> 50	++
23	> 50	++
24	> 50	+++
25	> 50	+++
26	> 50	++

Tab 3: CD133 positività' ed intensità di colorazione.

Si noti che a parte uno (25/26), tutti i pazienti sono risultati positivi al CD133 (96,5%) anche se con diverse intensità di colorazione, direttamente correlate con la concentrazione di cellule positive.

La positività al CD133 non è stata pertanto correlata a nessun'altra caratteristica clinicopatologica.

Abbiamo invece valutato l'intensità della colorazione in rapporto ad età, sesso, stadio ed estensione tumorale (T) ma non sono emersi risultati con significato statisticamente rilevante.

I fattori prognostici statisticamente significativi sono risultati l'estensione locale del tumore (T) e l'età del paziente: pazienti più anziani o con un'invasione locale maggiore avevano prognosi peggiore.

3. DISCUSSIONE

3.1 CELLULE STAMINALI TUMORALI E CANCRO

Diversi studi ipotizzano che il cancro sia primariamente dovuto alla perdita di regolazione dei meccanismi proliferativi di una minoranza di cellule a caratteristiche staminalità, le cellule staminali tumorali (CST). Queste cellule, capaci di self renewal e multilineage differentiation, acquisterebbero caratteristiche tumorali quali la crescita incontrollata e la diminuita dipendenza dall'ambiente circostante.^{2,176-177}

La comunità scientifica ha rivolto il suo interesse all'identificazione di queste cellule all'interno di ogni tipo tumorale in quanto direttamente responsabili della crescita tumorale e dell'invasione metastatica.

Per identificare le CST sono stati utilizzati inizialmente marker noti nelle cellule staminali normali. Queste molecole spesso erano coinvolte in pathways di attivazione cellulare inerenti ai processi di regolazione del ciclo cellulare, proliferazione e apoptosi. In altri casi, come per il CD133, la loro funzione non era nota.

L'interesse verso l'individuazione delle CST, che si sono finora dimostrate le più resistenti alle terapie con i farmaci finora noti, ha chiaramente enormi implicazioni terapeutiche poiché se davvero questa è la popolazione responsabile della crescita tumorigenica eliminandola completamente è possibile raggiungere la cura definitiva del tumore.

D'altra parte, una terapia mirata verso markers di staminalità non selettivi per cellule solo tumorali avrebbe un impatto significativo sulla rigenerazione cellulare nei tessuti sani, andando a distruggere le cellule staminali normali responsabili della ripopolazione del tessuto dopo danno (es. radiochemiorapie).

Da qui la necessità di identificare markers sempre più specifici per quella ristretta sottopopolazione tumorale.

3.2 CD 133 COME MARKER DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI

Il CD133 è una proteina di superficie appartenente alla famiglia delle prominine.

I ligandi nonché le funzioni di questa molecola di superficie rimangono tuttavia non ben definiti.

Inizialmente il CD133 fu isolato nei microvilli apicali dell'embrione e dell'adulto di topo e nelle punte microvillari delle cellule renali.¹⁷⁷ Data la sua localizzazione sulle protrusioni delle membrane cellulari si ipotizzò che avesse una funzione di regolatore della topologia delle membrane stesse.^{106-7, 177}

Dopo la sua identificazione in cellule progenitrici del sistema emopoietico, vari studi confermarono la sua funzione come marker di cellule staminali. Infatti, CD133+ dimostravano in vitro ed in vivo capacità di:

- 1) SELF RENEWAL: Gallascher et al ¹⁷⁸ in cui una popolazione di cellule di cordone ombelicale umano, ricca di CD133+, aveva capacità rigenerativa 400 volte superiore a cellule CD133- quando trapiantata in topi NOD/SCID (non obese diabetic/severely combined immunodeficient); Lang et al ¹⁷⁹ in cui il trapianto di linee CD133+ generavano ampia ripopolazione midollare
- 2) MULTILINEAGE DIFFERENTIATION: Torrente ¹¹³ et al in un modello di distrofia di Duchenne cellule staminali ematopoietiche CD133+ miglioravano il quadro distrofico attraverso la differenziazione in elementi muscolari.

Oltre che nel sistema ematopoietico, il CD133 fu identificato come marker staminali in diversi altri tessuti (vedi Fig. 16).^{123, 124, 127, 129-130, 132, 178-180}

Antigenic phenotype	Origin	Stem cell action
AC133 or CD133	Human adult blood, bone marrow, cord blood, and fetal liver	Human haematopoietic reconstitution
AC133	Human peripheral blood	Myogenesis in mouse model of Duchenne's muscular dystrophy
CD133	Human peripheral blood	Endothelial and cardiomyocytic differentiation <i>in vitro</i>
CD133	Adult human kidney	Endothelial and epithelial differentiation, human renal regeneration
CD133	Human bone marrow	Human liver regeneration, mechanism unknown
CD133	Human and mouse brain	Neural differentiation in mice
CD133, SSEA4	Mouse embryonic forebrain	Neural differentiation <i>in vitro</i>
AC133-2, $\beta 1$ -integrin	Human neonatal foreskin	Keratinocyte differentiation <i>in vitro</i>
CD133, $\beta 1$ -integrin	Human prostate basal cells	Prostatic acinar differentiation in mice
CD133 ⁺ CD34 ⁻ CD45 ⁻ Ter119 ⁻	Ductal epithelium neonatal mouse pancreas	Multiple lineage differentiation in mouse pancreas
CXCR4, NGN-3, nestin, CD133, Oct-4, Nanog, ABCG2, CD117	Human pancreas	Islet differentiation <i>in vitro</i>

Fig. 16 Espressione di CD133 come marker di cellule staminali da Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. J Pathol. 2008 Jan;214(1):3-9.¹⁷⁷

In seguito, si identificò il CD133 come marker di cellule staminali tumorali nelle leucemie mieloidi acute^{70,90} ed in una varietà di tumori solidi, inclusi i tumori coloretali (Vedi Fig.17).^{94-5,99-100,111, 127,133,181-3}

Antigenic phenotype	Tumour origin
CD133, CD44, $\alpha 1 \beta 2$	Human prostate tumours
CD133, ABCG2	Human pancreatic adenocarcinoma
CD133	Human colon carcinoma
CD133	Human hepatocellular carcinoma
CD133, nestin	Human neural tumours
CD133	Human renal tumours

Fig.17 Espressione di CD133 in vari tumori solidi da D. Mizrak et al CD133: molecule of the moment J Pathol 2008; 214: 3-9¹⁷⁷

3.3 CD 133 COME MARKER DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI NELLE NEOPLASIE COLORETTALI

I risultati di esperimenti di tumorigenicità eseguiti da O'Brien⁹⁹ e da Ricci¹⁰⁰ con popolazione di cellule di cancro coloretale indicano il CD133 come marker delle cellule staminali tumorali per 3 ragioni fondamentali:

- 1) cellule CD133+ erano negative per il CK20 (marker delle cellule epiteliali intestinali terminalmente differenziate e presente nel 75-95% delle cellule di CRC¹⁸⁴⁻⁵);
- 2) solo le cellule CD133+ producevano colonie tumorali con la tipica struttura a cripte del tumore primitivo dopo xenotrapianto in topi NOD/SCID;
- 3) La capacità di riprodurre neoplasia in vivo veniva persa quando le cellule venivano indotte a differenziazione terminale, indicata dalla comparsa di CK20.

In questi esperimenti la popolazione di cellule CD133+ all'interno della massa tumorale era stimata tra il 1-6 e il 25-29%.

Questi promettenti risultati non vengono completamente confermati da Dalerba¹⁰¹. In quest'ultimo studio l'espressione di CD133 nei campioni di CRC era estremamente variabile (alcuni completamente negativi, altri omogeneamente positivi, altri una combinazione variabile tra le due componenti) e soprattutto era meno specifica di altri markers quali EpCam (EpCam: molecola di adesione epiteliale, antigene di differenziazione epiteliale presente in numerosi tipi di carcinoma, coinvolto nell'attivazione di pathways intracellulari

connessi con la proliferazione e la polarità cellulare), CD44 o CD166. L'autore suggeriva un ruolo limitato di CD133 come marker delle CST.

Anche Haraguchi¹⁷¹ ha sottolineato che la combinazione di markers CD133/CD44, invece del solo CD133, ha maggiore specificità nell'individuare la popolazione di CST nel CRC. Nel suo studio solo popolazioni di cellule CD133+/CD44+, ma non CD133+/CD44- o CD133-/CD44-, erano in grado di generare tumore nel modello di topo (la scarsità di CD133-/CD44+ non ha permesso lo xenotrapianto di questa popolazione né lo studio della sua tumorigenicità in vivo).

La selettività di CD133 come marker di cellule staminali tumorali è stata seriamente messa in discussione da Karbanova¹⁶⁷ et al con l'aiuto di un nuovo e più specifico anticorpo monoclonale. Karbanova ha identificato il CD133 come marker generico delle membrane apicali o apicolaterali degli epitelii ghiandolari, giustificando i risultati di altri studi sulla base dell'uso di anticorpi non strutturalmente adeguati per riconoscere il CD133, ma solo un suo epitopo (AC133) che subirebbe in diverse circostanze modifiche conformazionali dando origine a falsi negativi.

Altri studi dimostrarono l'espressione di CD133 negli epitelii normali di dotti pancreatici nell'uomo, tubuli renali prossimali e dotti delle ghiandole mammarie.^{188,199-200}

Lo studio che più ha acceso la controversia sul ruolo effettivo di CD133+ come marker delle CST nel cancro coloretale è quello di Shmelkov¹⁶⁹, secondo il quale questo antigene viene espresso ubiquitariamente nell'epitelio colico differenziato di topi ed umani, sia normale che di cellule tumorali, e non può essere quindi ritenuto non specifico per le cellule multipotenti o progenitrici; ulteriore prova della non selettività di CD133 per le CST il fatto che cellule CD133- fossero in grado di rigenerare il tumore dopo xenotrapianto. (Vedi Fig.18).^{169,186}

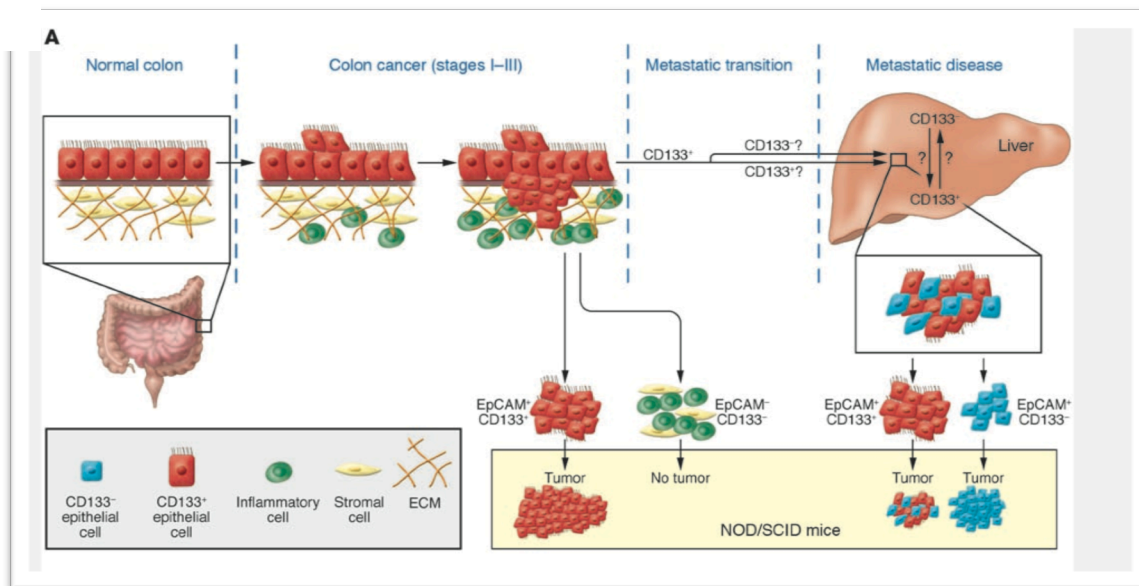


Fig. 18 Potenzialità tumorigeniche di CD133+ e CD133- da La Barge MA, Bissell MJ. Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells? J Clin Invest. 2008 Jun;118(6):2021-4¹⁸⁶

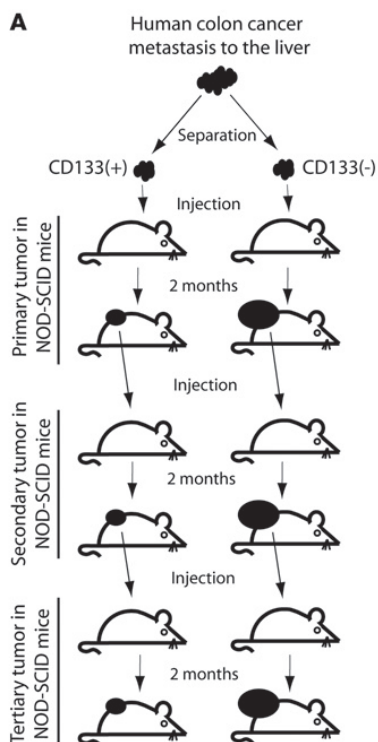


Fig. 19)

Fig. 19 da Shmelkov et al CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. J.Clin.Invest 2008; 118: 2111- 2120¹⁶⁹

Più precisamente, tutte le cellule dell'epitelio intestinale erano CD133+/EpCam+ e così anche tutte quelle dell'epitelio neoplastico; al contrario le cellule stromali erano tutte EpCam-/CD133- e non generavano tumori dopo xenotrapianto. Quando invece i campioni tumorali provenivano da metastasi epatiche di CRC, compariva una componente di cellule EpCAM+/CD133- ma sia le Cd133+ che CD133- erano in grado di trasmettere la neoplasia dopo trapianti seriali in topi NOD/SCID e la componente CD133- sosteneva una crescita tumorale più rapida (vedi

Shmelkov suggerì inoltre che la sottostima della positività a CD133 in precedenti studi poteva essere dovuta alla posizione ed all'angolo delle cripte nelle sezioni anatomopatologiche (vedi Fig.20).

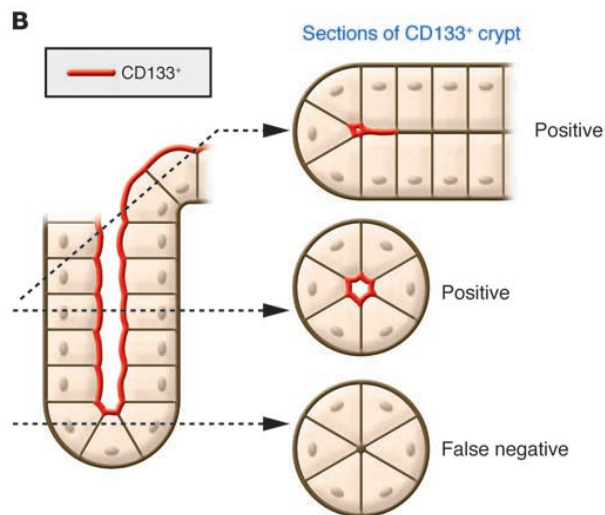


Fig 20 Meccanismi responsabili della sottostima di CD133 da LaBarge MA, Bissell MJ. Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells? J Clin Invest. 2008 Jun;118(6):2021-4¹⁸⁶

E'

importante ricordare che pur assumendo che il CD133 possa selezionare una popolazione con un ruolo significativo nell'iniziazione e trasmissione neoplastica, non tutte le cellule positive saranno propriamente cellule staminali tumorali (O'Brien stima 1/262); pertanto, questo marker da solo non può essere considerato come target farmacologico perché non abbastanza specifico. Una terapia selettivamente mirata verso cellule che lo esprimono sarebbe altamente tossica.¹⁸⁶

Come è possibile che i risultati sull'espressività di CD133 siano differenti?

Le interferenze nella determinazione della positività a CD133 sono dovute al fatto che la struttura e l'espressione di CD133 sono influenzate da molteplici fattori.

La falsa positività o negatività di una popolazione al CD133 potrebbe essere dovuta a:

1) **insufficiente selettività degli anticorpi** monoclonali verso l'epitopo AC133 la cui espressione può essere downregolata indipendentemente dall'espressione di CD133 (la distribuzione di CD133 mRNA, misurata anche con tecniche di RT-PCR, è infatti molto più estesa di quella di AC133)^{93,187-8} Inoltre è formalmente possibile che l'anticorpo anti AC133 riconosca altri epitopi glicosilati su molecole diverse dal CD133;¹⁸⁹

2) **attivazione di pathways intracellulari** che influenzano l'espressione di AC133 ma non necessariamente di CD133;¹⁸⁹

3) **variabilità proteica**: Ci sono molteplici varianti di *splicing* (**spliced isoforms**) sia negli umani che nel topo ed in alcune di queste potrebbe mancare l'epitopo AC133, riconosciuto da alcuni anticorpi^{178,190-1}. Kemper però dimostra che gli anticorpi monoclonali riconoscono epitopi posti sulla seconda ansa extracellulare della proteina, non influenzata da varianti di splicing;¹⁹²

4) **tensione di ossigeno** nel mezzo di coltura. L'espressione di CD133 è ridotta a concentrazioni di ossigeno crescenti;^{160, 193}

6) **ipermetilazione dell'isola CpG del promoter**: l'espressione di CD133 è regolata da processi di ipermetilazione dell'isola CpG nell'area del promoter di Cd133 e che questo produce una *downregulation* rendendo alcuni epitopi irraggiungibili da certi anticorpi

monoclonali. Questa downregulation è tipica in tumori ad alta aggressività indipendentemente dal ruolo potenziale di questo marker come delle CST. A conferma di questo l'osservazione che l'espressione di mRNA di CD133 non varia durante la differenziazione. Kemper ha dimostrato con tecniche di immunoblotting che durante la differenziazione non cambia l'espressione totale di CD133 ma varia la sua glicosilazione.

105,169,192,194-5

3.4 CD133 SIGNIFICATO PROGNOSTICO NEL CRC

Il cancro del colonretto rimane uno dei più diffusi tipi di cancro al mondo. L'incidenza di recidiva dopo chirurgia radicale è del 17.3% e la sopravvivenza a 5 anni del 69.9% (13.2% per i pazienti in stadio IV). Malgrado le innovazioni terapeutiche, chirurgiche e farmacologiche, la maggior parte dei pazienti morirà per recidiva di tumore.¹⁹⁶⁻¹⁹⁷

E' pertanto indispensabile identificare la popolazione a rischio di recidiva per poter intervenire tempestivamente e specificamente allo scopo di prevenirla ed eradicare completamente la malattia.

Fattori prognostici noti sono l'estensione locoregionale (T) e linfonodale (N) della malattia come anche l'angioinvasione o il grado istologico.

Alla luce delle nuove teorie che vedono le CST come responsabili della tumorigenesi, delle recidive e delle metastasi si è cercato di identificare nuovi fattori prognostici legati a queste cellule.

Alcuni autori hanno analizzato la positività al CD133 in relazione a parametri clinici ed evidenziato come tumori ad altra espressione di CD133+ fossero associati a caratteristiche di maggiore malignità, prognosi peggiore e più alta incidenza di chemioresistenza e metastasi.^{119,139,141,145,198-201}

Nakamura et al ¹⁵⁷ hanno identificato una correlazione positiva tra la positività per CD133+/CEA/CK20 nel lavaggio peritoneale di pazienti sottoposti a resezione per CRC ed incidenza di recidiva.

Horst et al ¹¹⁹ in uno studio di 77 pazienti affetti da CRC hanno osservato come popolazioni cellulari tumorali con alta espressione di CD133 (definita dalla positività >del 50% delle strutture pseudoghiandolari tumorali, identificate con uso di tre diversi anticorpi monoclonali) erano associati a prognosi peggiore. CD133 è risultato un fattore prognostico indipendente per la sopravvivenza a 5 e 10 anni sia nell'analisi uni che multivariata (p=0.002).

L'alta espressione di CD133 era presente in circa il 26% dei campioni esaminati.

Li et al analizzano una serie di 104 pazienti affetti da CRC stadio IIIb sottoposti a resezione chirurgica radicale. In questo gruppo il 40.4% presentava neoplasia ad alta espressività di CD133 (cut off >5%). In questa sottopopolazione, solo 7/104 (6.5%) aveva una positività superiore al 50% del totale.¹⁴⁵

La sopravvivenza dei pazienti con alta espressività era significativamente inferiore (p=0.001) e questo fattore era risultato fattore prognostico indipendente anche all'analisi multivariata.

Kojima ¹⁴¹ conferma la correlazione tra positività al CD133 e peggiore outcome in pazienti con adenocarcinoma ben e moderatamente differenziato (ma non negli scaramenti differenziati) in uno studio di 189 pazienti, di cui però solo 11,1% era stato classificato come CD133+. In questo studio il cutoff di positività era del 10%; all'analisi multivariata il

CD133 non era risultato però come fattore prognostico indipendente per la sopravvivenza, né per la comparsa di recidiva o metastasi.

Nel nostro studio è stato utilizzato solo un anticorpo monoclonale e la positività al CD133, considerando un cut off del 50%, (quindi molto più alto degli studi sopra citati) è risultata essere omogenea su tutta la popolazione 96.5% (25/26 pazienti). Per questo motivo non è stato possibile correlare la positività con altri fattori clinico-patologici. L'intensità della colorazione istochimica, funzione della concentrazione di cellule CD133 positive, non ha dimostrato significativa correlazione con la sopravvivenza o con altri parametri patologici quali il TNM.

Sebbene la percentuale di cellule staminali tumorali per ogni tipo di tumore non sia univocamente definita, è altamente improbabile che coinvolga più del 50% della popolazione cellulare tumorale. L'alta positività osservata includeva certamente anche cellule terminalmente differenziate.

Pertanto il nostro studio supporta la non specificità di CD133 come marker della sola popolazione di cellule staminali tumorali.

Quali sono le ragioni tra risultati così differenti?

Le potenziali spiegazioni sono riassunte qui di seguito:

1) l'identificazione di una popolazione arricchita di cellule staminali tumorali **varia ampiamente tra gli individui** ⁶⁴ e anche tra sottotipi tumorali diversi di uno stesso tessuto⁶⁵ perché si è ipotizzato che la percentuale della popolazione di CST dipenda infatti dal tessuto di origine, dal microambiente stromale, dalle modificazioni somatiche accumulate e dallo stadio di malignità raggiunto dal tumore.^{32,43,66} Nondimeno, gli stessi markers potrebbero avere significati diversi in tumori di tipo differente;

2) ciascun gruppo di ricerca ha utilizzato **cut-off diversi** per definire la positiva' al CD133 (dal 5% fino al 50%);

3) l'utilizzo di **metodologie eterogenee**: da mRNA in RT-PCR a studi di immunoistochimica con anticorpi monoclonali, singoli o multipli, specifici per epitopi diversi, la cui espressione cambia in seguito a processi di glicosilazione o in seguito ad alcuni particolari trattamenti (come spiegato sopra).^{169,192}

4) Alterazioni dovuti a **tecniche non accurate**: il trattamento enzimatico usato durante la preparazione della sospensione cellulare pretrapianto potrebbe modificare i markers di superficie e quindi determinare un errore di selezione.²⁰²

Per limitare le interferenze e selezionare una popolazione purificata e presumibilmente arricchita di CST durante la dissociazione cellulare dei tumori solidi è necessario ottimizzare le condizioni per preservare la vitalità cellulare e l'espressione dei markers di superficie.

Durante la separazione cellulare prima del trapianto dalla popolazione di CST che si vuole studiare è necessario escludere con tecniche di citometria a flusso: cellule morte, cellule di origine ematopoietica, cellule endoteliali e stromali la cui presenza potrebbe alterare i risultati.

Una volta separate le due popolazioni tumorigenica e non, bisogna dimostrare se la differenza tra le due è solo epigenetica o genetica. La popolazione tumorigenica dovrà inoltre dimostrare di contenere cellule tumorali vive. (Vedi Fig. 21)

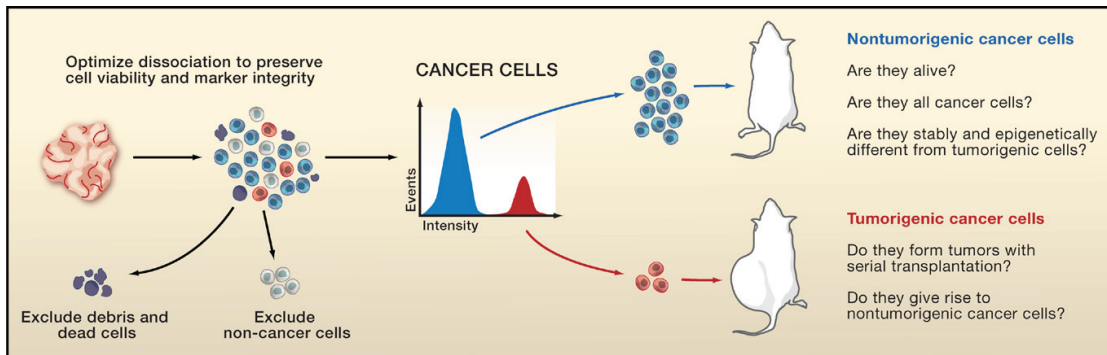


Fig.21 Come testare il modello di cellula staminale da Shackleton et al Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. Cell. 2009 Sep 4;138(5):822-9.⁷⁸

5) l'utilizzo di sedi diverse d'impianto delle cellule tumorali: alcuni tessuti sono più favorevoli di altri all'attecchimento del graft (ad esempio la capsula renale invece del sottocute). Inoltre i mezzi di coltura hanno un impatto significativo sulle capacità di crescita. Per es. in alcuni studi effettuati su cellule di carcinoma mammario, la crescita tumorale dopo trapianto era significativamente aumentata dalla presenza di Matrigel (sostanza simile alla membrana basale, ricca in fattori di crescita).²⁰³⁻⁴

E' noto che il successo dello xenotrapianto nel topo dipende anche dalla capacità di **evasione del sistema immunitario** del ricevente. Si è osservato infatti che la risposta immunitaria del topo dopo trapianto di cellule tumorali umane è sempre presente ma è tanto più ridotta quanto più severamente immunocompromesso è il modello animale. Malgrado sia limitata in topi NOD/SCID può comunque influenzare l'*engraftment* di cellule tumorali e quindi limitarne la capacità di crescita.^{3,32,64,205-7} Per esempio, la percentuale di cellule di melanoma capaci di generare il tumore primitivo in topi NOD/SCID/IL2y- (knockout per il recettore di IL-2) quindi incapaci di generare risposta con linfociti B T e NK , era esponenzialmente superiore a quella delle cellule trapiantate in topi NOD/SCID (che mantenevano una risposta NK).³² Sia popolazioni CD133+ che CD133- erano infatti in

grado di generare tumore in topi NOD/SCID/IL2-. Inoltre popolazioni CD133- generavano progenie mista, CD133+ e -, dimostrando la capacità di riprodurre la stessa eterogeneità del tumore primitivo.

La tumorigenicità può variare drasticamente da condizioni *in vitro* a *in vivo* e anche da tumore primitivo a metastasi.⁷⁸

6) la maggior parte dei markers che sono stati studiati, incluso il CD133, sono stati scelti in base al loro pattern di espressione in cellule ritenute staminali invece che per la **funzione** che svolgono. Alcuni di questi hanno un ruolo nell'indurre o mantenere i rapporti intercellulari o tra cellula e matrice. I risultati degli esperimenti di xenotrapianto utilizzando popolazioni cellulari altamente purificate di un particolare marker. Questo potrebbe offrire a queste popolazioni un vantaggio di crescita nel modello animale.²⁰⁸

3.5 CD133 e CHEMIORADIORESISTENZA

I pazienti affetti da cancro del retto, malgrado la riduzione della massa tumorale con radioterapia hanno un tasso di recidiva, in assenza di chirurgia, che si avvicina all'80%.²⁰⁹

La recidiva rimane la maggiore causa di morte in pazienti affetti da cancro del CRC anche dopo radiochemioterapia preoperatoria e chirurgia radicale con TME.²¹⁰⁻¹²

Le CST si sono dimostrate particolarmente resistenti ai trattamenti farmacologici.

Il CD133 è stato associato ad aumentata chemioradiosensibilità in diversi tumori^{147,214} incluso il cancro coloretale^{139, 165, 214-5}, sebbene non sia chiaro se questa molecola sia direttamente connessa con i meccanismi di resistenza o se rappresenti solo il marker di una popolazione maggiormente aggressiva.

A cosa potrebbe essere dovuta la chemio-radioresistenza delle CST?

1) Gli agenti chemioterapici hanno come bersaglio cellule differenziate a più rapido turnover;^{216,140,24}

2) le cellule staminali esprimono caratteristicamente proteine di **multidrug resistance** (i trasportatori MDR1 e APC). Tali proteine forniscono un'ulteriore protezione trasportando i chemioterapici all'esterno del citosol e fornendo un' aumentata resistenza all'apoptosi chemioindotta.^{24,35,139}

Se le CST esprimono le stesse proteine potrebbero anch'esse essere costituzionalmente resistenti alla RCT. Questo potrebbe spiegare il fallimento terapeutico nella cura della malattia recidiva e metastatica, malgrado una iniziale risposta. La chemioradioterapia eliminerebbe cellule più differenziate, selezionando una popolazione di cellule staminali più resistenti, responsabili in seguito della ricrescita del tumore.

3) aumentata capacità di riparazione del DNA; ad es. nei gliomi si è dimostrato che la chemioradioresistenza del tumore può essere correlata ad un potenziato meccanismo di *mismatch repair*, con efficace correzione delle mutazioni potenzialmente letali;^{147, 213}

4) la radioterapia non ha un effetto rilevante sulla capacità di autorigenerazione delle CST.¹⁵⁸

Nel nostro studio non è stato possibile valutare la relazione tra CD133 e resistenza ai chemioterapici dopo in quanto tutti i tumori risultavano immunoistochimicamente positivi. Comunque, la nostra serie da noi analizzata era numericamente molto limitata e qualsiasi risultato statisticamente significativo sarebbe da interpretare alla luce di questo.

4. CONCLUSIONI

Il CD133 è stato isolato su diversi epiteliali normali e su più popolazioni tumorali. Sebbene alcuni autori dimostrino la sua associazione con cellule a potenziale staminale, altri marker (CD44, Lgr5, EpCAM) o la combinazione di più markers, si sono dimostrati più specifici per l'identificazione delle CST.

L'estrema eterogeneità dei metodi e dei campioni utilizzati nei vari studi rende il confronto particolarmente complesso, talvolta non fattibile.

La maggior parte degli studi clinici sono a carattere retrospettivo, su campioni di piccole dimensioni. Spesso i gruppi di pazienti hanno caratteristiche clinicopatologiche (per. es. stadio TNM, grado istologico) e terapeutiche (regimi di chemioterapia e radiochemioterapia con combinazioni differenti di farmaci) molto eterogenee.

La scarsa conoscenza dei meccanismi che regolano l'interazione, la proliferazione e la differenziazione cellulare, nonché i limiti delle metodiche finora disponibili ed il loro utilizzo variegato, pongono serie limitazioni al significato dei risultati ottenuti.

Il nostro studio si allinea con precedenti risultati che supportano l'ampia rappresentazione di CD133 negli epiteli tumorali colici e la non selettività di questa molecola per la componente staminale tumorale; date le presenti limitazioni (limitato numero di pazienti, utilizzo di unico anticorpo monoclonale) non è possibile attribuire un significato determinante ai risultati ottenuti.

La revisione della letteratura non porta comunque a conclusioni definitive e la dibattito rimane acceso su diversi argomenti: l'esistenza delle cellule staminali tumorali ed il loro ruolo come uniche motrici della diffusione tumorale, l'identificazione di specifici markers

delle CST all'interno di ogni tipo tumore e il vantaggio terapeutico che questi markers potrebbero avere.

Sono necessari studi con un maggior numero di casi, che utilizzino metodiche simili e popolazioni di pazienti con caratteristiche clinico-patologiche comparabili per verificare il ruolo di CD133 e di altre molecole come marker delle CST. Saranno necessari ulteriori esperimenti per chiarire se e quali tumori seguono il modello staminale e non quello clonale o se intervengono entrambi, ma in momenti diversi, nel processo di tumorigenesi. Inoltre, fino alla completa comprensione dei meccanismi che regolano la genesi e l'espansione tumorale, non è opportuno dirigere le terapie solo verso l'eliminazione di una popolazione staminale ancora di non certa caratterizzazione, quando i farmaci finora noti sono capaci di aggredire almeno una parte della popolazione tumorale.

Creare terapie *ad hoc*, per ogni specifico paziente, utilizzando strategie molteplici (chemioterapici e terapia genica) sarà il prossimo passo avanti.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Pardal R Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 895–90
2. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001, Vol 414:105–111
3. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):4793-807
4. Morrison, S. J., Hemmati, H. D., Wandycz, A. M. & Weissman, I. L. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1995, 92:10302–10306
5. Morrison SJ Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer *Nature* 29 June 2006, Vol 441: 1068-74
6. Betschinger, J. & Knoblich, J. A. Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr. Biol.* 2004, 14, R674–R685
7. Clevers, H. Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nature Genet* 2005, 37: 1027–1028
8. Doe, C. Q. & Bowerman, B. Asymmetric cell division: fly neuroblast meets worm zygote. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001, 13: 68–75
9. Yamashita, Y. M., Fuller, M. T. & Jones, D. L. Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. *J. Cell Sci.* 2005, 118: 665–672
10. Haifan Lin, Trista Schagat, Neuroblasts: a model for the asymmetric division of stem cells, *Trends in Genetics*, January 1997, Vol 13 (1): 33-3
11. Kimble, J. E. & White, J. G. On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 1981, 81:208–219

12. Lechler, T. & Fuchs, E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 2005, 437:275–280
13. Wright, D. E. et al. Cyclophosphamide/granulocyte colony stimulating factor causes selective mobilization of bone marrow hematopoietic stem cells into the blood after M phase of the cell cycle. *Blood* 2001, 97: 2278–2285
14. Morrison, S. J., Wright, D. & Weissman, I. L. Cyclophosphamide/granulocyte colony stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1997, 94:1908–1913
15. Bodine, D., Seidel, N. E. & Orlic, D. Bone marrow collected 14 days after in vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to mice has 10-fold more repopulating ability than untreated bone marrow. *Blood* 1996 , 88: 89–97
16. Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 2002, 36: 1021–1034
17. Cheshier, S., Morrison, S. J., Liao, X. & Weissman, I. L. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1999, 96: 3120–3125
18. Morshead, C. M. et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 1994, 13: 1071–1082
19. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 2009 Jan 29;457:608-11.
20. Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007; 449:1003–1007.

21. Cairns, J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975, 255:197–200
22. Potten, C. S., Owen, G. & Booth, D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J. Cell Sci.* 2002, 115 (11): 2381–2388
23. Potten, C. S., Hume, W. J., Reid, P. & Cairns, J. The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell* 1978, 15: 899–906
24. McDonald SA, Preston SL, Lovell MJ, Wright NA, Jankowski JA. Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2006; 3: 267–74.
25. Potten, C. S., Kellett, M., Rew, D. A. & Roberts, S. A. Proliferation in human gastrointestinal epithelium using bromodeoxyuridine in vivo: data for different sites, proximity to a tumour, and polyposis coli. *Gut* 1992, 33: 524–529
26. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 1974;141:537–561
27. Todaro M, Francipane MG, Medema JP, Stassi G. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2151
28. S. Zeki, Trevor A. Graham & Nicholas A. Stem cells and their implications for colorectal cancer Wright *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* February 2011, 8:90-100
29. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T Stem cells find their niche. *Nature*. 2001 Nov 1;414:98-104.
30. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006; 311:1880–5
31. Bissell MJ, Labarge MA. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell* 2005; 7: 17–23

32. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*. 2008;456:593–598
33. Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick MR, Kemper K, Richel DJ, Stassi G, Medema JP. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2010 May;12(5):468-76.
34. Orimo A, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/ CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335–348
35. Miller SJ, Lavker RM, Sun TT. Interpreting epithelial cancer biology in the context of stem cells: tumor properties and therapeutic implications. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1756: 25–52.
36. DS Krause Plasticity of marrow-derived stem cells *Gene Therapy* (2002) 9, 754–758
37. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7
38. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002;297:2256–9
39. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cell differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;15:364–70
40. Lagasse, E. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate to hepatocytes in vivo. *Nature Med*. 2000, 6: 1229–1234
41. Krause, D. S. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell. *Cell* 2001, 105:369–377
42. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:675-99.

43. B Gupta, C L Chaffer, R A Weinberg Cancer stem cells: mirage or reality? *Nature Medicine* 2009, 15: 1010 - 1012
44. Kim KM, Calabrese P, Tavaré S, Shibata D. Enhanced stem cell survival in familial adenomatous polyposis. *Am. J. Pathol.* 2004; 164: 1369–77.
45. Kim KM, Shibata D. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene* 2002; 21: 5441–9
46. Clarke MF, et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006; 66(19):9339–9344
47. Taipale, J. & Beachy, P. A. The hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 2001, 411:349–354
48. Zhu, Y. & Parada, L. F. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nature Rev. Cancer* 2002, 2: 616–626
49. Park, I. K. et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003, 423, 302–305
50. Lessard, J. & Sauvageau, G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 2003, 423: 255–260
51. Polakis, P. The oncogenic activation of β -catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999, 9, 15–21
52. Zhu, A. J. & Watt, F. M. β -catenin signalling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. *Development* 1999, 126, 2285–2298
53. Willert, K. et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003, 423: 448–452
54. Wechsler-Reya, R. J. & Scott, M. P. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 1999, 22:103–114

55. Domen, J., Gandy, K. L. & Weissman, I. L. Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood* 1998, 91, 2272–2282
56. Domen, J. & Weissman, I. L. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other. *J. Exp. Med.* 2000, 192, 1707–1718
57. Humbert, P., Russell, S. & Richardson, H. Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *BioEssays* 2003, 25, 542–553
58. Joslyn, G. et al. Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* 1991, 66:601–613
59. Kinzler, K. W. et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991, 253:661–665
60. Van de Wetering, M. et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002, 111:241–250
61. Lee, C.-Y., Robinson, K. J. & Doe, C. Q. Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* 2006, 439:594–598
62. Regala, R. P. et al. Atypical protein kinase Ciota plays a critical role in human lung cancer cell growth and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.* 2005, 280:31109–31115
63. Regala, R. P. et al. Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2005, 65: 8905–8911
64. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):730-7
65. Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lövgren K, Grabau D, Fernö M, Borg A, Hegardt C. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R53.

66. Kelly, P.N., Dakic, A., Adams, J.M., Nutt, S.L. & Strasser, A. *Science* 2007, 317: 337
67. Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest.* 2010; 120:41–50
68. Neureiter D, Herold C, Ocker M. Gastrointestinal cancer – only aderegulation of stem cell differentiation? *Int. J. Mol. Med.* 2006; 17: 483–9.
69. Douard R, Moutereau S, Pernet P et al. Sonic hedgehog-dependent pro- liferation in a series of patients with colorectal cancer. *Surgery* 2006; 139: 665–70.
70. Bruce WR, Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature.* 1963; 199:79–80.
71. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science.* 1977; 197:461–3.
72. Brunschwig A, Southam CM, Levin AG. Host resistance to cancer. Clinical experiments by homotransplants, autotransplants and admixture of autologous leucocytes. *Ann Surg.* 1965; 162:416–25
73. Southam, C. M. & Brunschwig, A. Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. *Cancer* 1961, 14: 971–978
74. Salsbury, A. J. The significance of the circulating cancer cell. *Cancer Treatment Rev.* 1975, 2:55–72
75. Kummermehr, J. & Trott, K.-R. in *Stem Cells* (ed. Potten, C. S.) 363–399 (Academic, New York, 1997).
76. Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, et al. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell.* 2010;141:583–94.
77. Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell.* 2010;140:62–73

78. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*. 2009 Sep 4;138(5):822
79. Williams, S. D. Treatment of disseminated germ cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N. Engl. J. Med.* 1987, 316:1435–1439
80. Stockler, M., Wilcken, N. R. C., Ghersi, D. & Simes, R. J. Systematic reviews of chemotherapy and endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer Treatment Rev.* 2000, 26: 151–168
81. Lippman, M. E. High-dose chemotherapy plus autologous bone marrow transplantation for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2000, 342: 1119–1120
82. Harrison, D. E. & Lerner, C. P. Most primitive hematopoietic stem cells are stimulated to cycle rapidly after treatment with 5-fluorouracil. *Blood* 1991, 78:1237–1240
83. Bouwens, L. & DeBlay, E. Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* 1996, 44:947–951
84. Peters, R., Leyvraz, S. & Perey, L. Apoptotic regulation in primitive hematopoietic precursors. *Blood* 1998, 92:2041–2052
85. Feuerhake, F., Sigg, W., Hofter, E. A., Dimpfl, T. & Welsch, U. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 and Bax expression in relation to cell turnover and epithelial differentiation markers in the non-lactating human mammary gland epithelium. *Cell Tissue Res.* 2000, 299: 47–58
86. Kamper Grandela Medema Molecular identification and targeting of Colorectal cancer stem cell Oncotarget, October vol 1, n 6, 2010.
87. Gostjeva EV, Zukerberg L, Chung D, Thilly WG. Bell-shaped nuclei dividing by symmetrical and asymmetrical nuclear fission have qualities of stem cells in human colonic embryogenesis and carcinogenesis. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2006; 164: 16–24

88. Ohm JE, McGarvey KM, Yu X et al. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat. Genet.* 2007; 39: 237–42.
89. Widschwendter M, Fiegler H, Egle D et al. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat. Genet.* 2007; 39: 157–8.
90. Wodinsky, I., Swiniarski, J. & Kensler, C. J. Spleen colony studies of leukemia L1210. I. Growth kinetics of lymphocytic L1210 cells in vivo as determined by spleen colony assay. *Cancer Chemother. Rep.* 1967, 51: 415–421
91. Lapidot, T. et al. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994, 17, 645–648
92. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2003, 100: 3983–3988
93. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five- transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997;90(12):5013–21.
94. Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 2007;120(7):1444–50.
95. Singh, S. K. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumours. *Cancer Res.* 63, 5821–5828 (2003).
96. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature.* 2008; 451:345–9.
97. Boiko AD, Razorenova OV, van de Rijn M, et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature.* 2010; 466:133–7.

98. Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, Chung CH, Lu B. Cell surface phenotype of cancer stem cells. A summary of cancer stem cells surface markers identified in a variety of cancer types. *J Oncol.* 2011;2011:941876.
99. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007; 445:106–110.
100. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon- cancer-initiating cells. *Nature.* 2007; 445:111–115.
101. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:10158–10163.
102. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 2009; 69:3382–9.
103. Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, Chung CH, Lu B. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol.* 2011;2011:941876.
104. Fargeas CA, Florek M, Huttner WB, Corbeil D. Characterization of prominin-2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins. *J Biol Chem.* 2003;278:8586–96.
105. Yu X, Lin Y, Yan X, Tian Q, Li L, Lin EH. CD133, Stem Cells, and Cancer Stem Cells: Myth or Reality? *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2011 Dec;7(4):253-259.
106. Roper K, Corbeil D, and Huttner WB. Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nature Cell Biology* 2000; 2: 582-592
107. Corbeil D, Roper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB. Pro- minin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic* 2001;2:82–91.

108. Roper K, Corbeil D, Huttner WB. Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nature Cell Biol* 2000;2:582–592.
109. Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Brauninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, et al. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci* 2005;118:2849 – 2858.
110. Giebel B, Corbeil D, Beckmann J, Hohn J, Freund D, Giesen K, Fischer J, Kogler G, and Wernet P. Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 2004; 104: 2332-2338
111. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002–5012
112. Green CL, Loken M, Buck D, Deeg HJ. Discordant expression of AC133 and AC141 in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myelogenous leukemia (AML). *Leukemia* 2000; 14:770–2
113. Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, D'Antona G, et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004;114:182 – 195
114. Kim M, Koh YJ, Kim KE, et al. CXCR4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche. *Cancer Res.* 2010;70:10411–21.
115. Ma S, Lee TK, Zheng BJ, et al. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene.* 2008;27:1749–58.

116. Chen YC, Hsu HS, Chen YW, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One*. 2008;3:e2637.
117. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:13427–32.
118. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007;1:313–23.
119. Horst D, Kriegel L, Engel J, et al. CD133 and nuclear beta-catenin: the marker combination to detect high risk cases of low stage colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2009;45:2034–40.
120. Matsumoto K, Arao T, Tanaka K, et al. mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. *Cancer Res*. 2009;69:7160–
121. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:14720–14725.
122. Lee A, Kessler JD, Read TA, Kaiser C, Corbeil D, Huttner WB, et al. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nature Neurosci* 2005;8:723–729.
123. Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on prominin-1 expression. *Exp Neurol* 2007;205:547–562
124. Barraud P, Stott S, Møllgaard K, Parmar M, Björklund A. In vitro characterization of a human neural progenitor cell coexpressing SSEA4 and CD133. *J Neurosci Res* 2007;85:250–259

125. A. Salmaggi, A. Boiardi, M. Gelati, A. Russo, C. Calatozzolo, E. Ciusani, F.L. Sciacca, A. Ottolina, E.A. Parati, C. La Porta, G. Alessandri, C. Marras, D. Croci, M. De Rossi, Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype, *Glia* 54 (2006) 850–860.
126. G. Liu, X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I.R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K.L. Black, J.S. Yu, Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma, *Mol. Cancer* 5 (2006) 67
127. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 2005;166:545–555.
128. S.K. Singh, I.D. Clarke, M. Terasaki, V.E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, P.B. Dirks, Identification of a cancer stem cell in human brain tumors, *Cancer Res.* 2003,63:5821–5828.
129. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. Isolation and characterization of human CD34(–)Lin(–) and CD34(+)Lin(–) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 2000;95:2813 – 2820.
130. Lang P, Bader P, Schumm M, Feuchtinger T, Einsele H, Fuhrer M, et al. Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol* 2004;124:72 – 79.
131. Bitan M, Shapira MY, Resnick IB, Zilberman I, Miron S, Samuel S, et al. Successful transplantation of haploidentically mismatched peripheral blood stem cells using CD133+-purified stem cells. *Exp Hematol* 2005;33:713 – 718.

132. Oshima Y, Suzuki A, Kawashimo K, Ishikawa M, Ohkohchi N, Taniguchi H. Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting. *Gastroenterology* 2007;132:720–732.
133. A.T. Collins, P.A. Berry, C. Hyde, M.J. Stower, N.J. Maitland NJ, Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, *Cancer Res.* 65 (2005) 10946–109
134. Maitland NJ, Collins AT. Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol.* 2008;26:2862–70.
135. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007;1:313–23.
136. Jaksch M, Munera J, Bajpai R, et al. Cell cycle-dependent variation of a CD133 epitope in human embryonic stem cell, colon cancer, and melanoma cell lines. *Cancer Res.* 2008;68:7882–6.
137. Corbeil D, Marzesco AM, Wilsch-Brauninger M, Huttner WB. The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol- based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. *FEBS Lett.* 2010;584:1659– 64
138. Hill RP. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):1891-5; discussion 1890
139. Ong CW Kim LG, Kong HH, Low LY, Iacopetta B, Soong R, Salto-Tellez M. CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2010 Mar;23(3):450-7.
140. Wang Q , Chen ZG, Du CZ, Wang HW, Yan L, Gu J. Cancer stem cell marker CD133+ tumour cells and clinical outcome in rectal cancer. *Histopathology.* 2009 Sep;55(3):284-93.

141. Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Fujii S, Saito N, Ochiai A. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci.* 2008 Aug;99(8):1578-83
142. Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2009;16:3488–98
143. Li G, Liu C, Yuan J, et al. CD133(+) single cell-derived progenies of colorectal cancer cell line SW480 with different invasive and metastatic potential. *Clin Exp Metastasis.* 2010; 27:517
144. Bertolini G, Roz L, Perego P, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:16281–6.
145. Li CY, Li BX, Liang Y, et al. Higher percentage of CD133+ cells is associated with poor prognosis in colon carcinoma patients with stage IIIB. *J Transl Med.* 2009;7:56.
146. Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, et al. Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS One.* 2008;3:e3077.
147. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006;444:756–60.
148. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, et al. Stem cell-related “self- renewal” signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemo- radiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2008;26:3015–24
149. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C (2007) Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1: 313–323

150. Maeda S, Shintani H, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Sato M, Natsugoe S, Aikou T, Takao S (2008) CD133 expression is correlated with lymphnode metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 98: 1389–1397
151. Choi D, Lee HW, Hur KY, Kim JJ, Park GS, Jang SH, Song YS, Jang KS, Paik SS. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2009 May 14;15(18):2258-64
152. Lin EH, Hassan M, Li Y, et al.: Elevated circulating endothelial progenitor marker CD133 messenger RNA levels predict colon cancer recurrence. *Cancer* 2007;110:534–42.
153. Mehra N, Penning M, Maas J, et al. Progenitor marker CD133 mRNA is elevated in peripheral blood of cancer patients with bone metastases. *Clin Cancer Res* 2006;12(16):4859–66.
154. Iinuma H, Watanabe T, Mimori K, et al.: Clinical significance of circulating tumor cells, including cancer stem-like cells, in peripheral blood for recurrence and prognosis in patients with Dukes' Stage B and C Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2011, 29(11):1547-1555
155. Iinuma H, Okinaga K, Egami H, et al. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2006;28:297–306.
156. Hayama T, Iinuma H, Watanabe T: Rapid genetic diagnosis with transcription-reverse transcription concerted reaction system for peritoneal recurrence and survival in colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 2007; 18:779–784
157. Nakamura K, Iinuma H, Aoyagi Y, et al. Predictive value of cancer stem-like cells and cancer-associated genetic markers for peritoneal recurrence of colorectal cancer in patients after curative surgery. *Oncology*. 2010;78:30

158. C. E. Eyler and J. N. Rich, "Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 17, pp. 2839–2845, 2008.
159. W. A. Woodward, M. S. Chen, F. Behbod, M. P. Alfaro, T. A. Buchholz, and J. M. Rosen, "WNT/ β -catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 2, pp. 618–623, 2007.
160. E. R. Blazek, J. L. Foutch, and G. Maki, "Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133⁻ cells, and the CD133⁺ sector is enlarged by hypoxia," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 67, no. 1, pp. 1–5, 2007.
161. Smith LM, Nesterova A, Ryan MC, et al. CD133/ prominin-1 is a potential therapeutic target for anti- body-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br J Cancer* 2008;99:100–109.
162. Matilde T, Mileidys PA, Anna BDS et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007; 1; 389–402.
163. Ieta K, Tanaka F, Haraguchi N, et al. Biological and genetic characteristics of tumor-initiating cells in colon cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(2):638–48.
164. Jeremy NR, Shideng B. Chemotherapy and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2007; 1; 353–355.
165. Dallas NA, Xia L, Fan F, et al. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res* 2009;69(5):1951–7

166. Neuzil J, Stantic M, Zobalova R, et al. Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: what's in the name? *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355(4):855–9
167. Karbanova J, Missol-Kolka E, Fonseca AV, Lorra C, Janich P, Hollerova H, Jaszai J, Ehrmann J, Kolar Z, Liebers C, Arl S, Subrtova D, Freund D, Mokry J, Huttner WB, and Corbeil D. The Stem Cell Marker CD133 (Prominin-1) Is Expressed in Various Human Glandular Epithelia. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2008; 56: 977-99
168. Artells R, Moreno I, Díaz T, Martínez F, Gel B, Navarro A, Ibeas R, Moreno J, Monzó M. Tumour CD133 mRNA expression and clinical outcome in surgically resected colorectal cancer patients. *Eur J Cancer*. 2010 Feb;46(3):642-9
169. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, and Rafii S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J.Clin.Invest* 2008; 118: 2111- 2120
170. Dittfeld C, Dietrich A, Peickert S, Hering S, Baumann M, Grade M, Ried T, Kunz-Schughart LA. CD133 expression is not selective for tumor-initiating or radioresistant cell populations in the CRC cell line HCT-116. *Radiother Oncol*. 2010 Mar;94(3):375-83.
171. Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, et al. CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Ann Surg Oncol*. 2008; 15:2927–33
172. Du L, Wang HY, He LY, Zhang JY, Ni BY, Wang XH, Jin HJ, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu YY, and Chen Q. CD44 is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells. *Clinical Cancer Research* 2008; 14: 6751-6760
173. Horst D, Scheel SK, Liebmann S, Neumann J, Maatz S, Kirchner T, and Jung A. The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional

- relevance for the metastasis of human colon cancer. *Journal of Pathology* 2009; 219: 427-434
174. American Joint Committee on Cancer, Staging Manual 5th Edition. Lippincott-Raven 1997
175. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007;58:267-84.
176. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med.* 2006 Sep 21;355(12):1253-61.
177. Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 2008 Jan;214(1):3-9
178. Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J. AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J Biol Chem* 2002;277:20711 – 20716
179. Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 2004;117:3539–3545.
180. Koblas T, Zacharovova K, Berkova Z, Mindlova M, Girman P, Dovolilova E, et al. Isolation and characterization of human CXCR4-positive pancreatic cells. *Folia Biol (Praha)* 2007;53:13 – 2
181. Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F, Kalthoff H. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007;6:92 – 97.
182. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:820 – 824.

183. Yi L, Zhou ZH, Ping YF, Chen JH, Yao XH, Feng H, et al. Isolation and characterization of stem cell-like precursor cells from primary human anaplastic oligoastrocytoma. *Mod Pathol* 2007;20:1061 – 1068.
184. Rubin BP, Skarin AT, Pisick E, et al. Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur J Cancer Prev* 2001;10:77–82.
185. Moll R, Lowe A, Laufer J, et al. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1992;140:427–447
186. LaBarge MA, Bissell MJ. Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells? *J Clin Invest.* 2008 Jun;118(6):2021-4
187. Corbeil D, Roper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM, Simmons PJ, Peault B, Buck DW, Huttner WB. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem.* 2000; 275:5512–5520
188. Florek M, Haase M, Marzesco AM, Freund D, Ehninger G, Huttner WB, Corbeil D. Prominin-1/ CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res.* 2005; 319:15–26
189. Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med (Berl).* 2008 Sep;86(9):1025-32
190. Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, McGarrigle D, Derderian CA, Usenko JK, Costa C, Zhang F, Guo X, Rafii S. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood.* 2004; 103:2055–2061

191. Fargeas CA, Joester A, Missol-Kolka E, Hellwig A, Huttner WB, Corbeil D. Identification of novel prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis. *J Cell Sci.* 2004; 117:4301–4311.
192. Kemper K, Sprick MR, de Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, Hoek M, Zeilstra J, Pals ST, Mehmet H, Stassi G, Medema JP. The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res.* 2010 Jan 15;70(2):719-29
193. Platet N, Liu SY, Atifi ME, Oliver L, Vallette FM, Berger F, Wion D. Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett.* 2007; 258:286–290
194. Jeon YK, Kim SH, Choi SH, Kim KH, Yoo BC, Ku JL, and Park JG. Promoter hypermethylation and loss of CD133 gene expression in colorectal cancers. *World Journal of Gastroenterology* 2010; 16: 3153-3160
195. Taieb N, Maresca M, Guo XJ, Garmy N, Fantini J, and Yahi N. The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif. *Cancer Lett.* 2009; 278: 164-173
196. Meyerhardt JA and Mayer RJ: Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 352: 476-487, 2005.
197. Hecht JR: Current and emerging therapies for metastatic colorectal cancer: applying research findings to clinical practice. *Am J Health Syst Pharm* 65 (11 Suppl. 4): S15- S21, 2008
198. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, Lichter P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende CC: Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 2008, 14(1):123-129.
199. Florek M, Haase M, Marzesco AM, Freund D, Ehninger G, Huttner WB, Corbeil D Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult

human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res.* 2005 Jan;319(1):15-26

200. Immervoll H, Hoem D, Steffensen OJ, Miletic H, Molven A. Visualization of CD44 and CD133 in normal pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas: non-overlapping membrane expression in cell populations positive for both markers. *J Histochem Cytochem.* 2011 Apr;59(4):441-55.

201. Takahashi S, Kamiyama T, Tomaru U, Ishizu A, Shida T, Osaka M, Sato Y, Saji Y, Ozaki M, Todo S. Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients. *Oncol Rep.* 2010 Nov;24(5):1201-

202. Hill RP. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res.* 2006; 66: 1891–5

203. Mullen P. The use of Matrigel to facilitate the establishment of human cancer cell lines as xenografts. *Methods Mol Med* 2004;88:287–92.

204. Mehta RR, Graves JM, Hart GD, Shilkaitis A, Das Gupta TK. Growth and metastasis of human breast carcinomas with Matrigel in athymic mice. *Breast Cancer Res Treat* 1993;25:65–71

205. McKenzie, J.L., Gan, O.I., Doedens, M., and Dick, J.E. *Blood* 2005, 106: 1259–1261.

206. Kennedy JA, Barabé F, Poepl AG, Wang JC, Dick JE. Comment on "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells". *Science.* 2007 Dec 14;318(5857):1722; author reply 1722.

207. Feuring-Buske M, Gerhard B, Cashman J, Humphries RK, Eaves CJ, Hogge DE. Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in beta 2-microglobulin-deficient NOD/SCID mice and in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors. *Leukemia.* 2003 Apr;17(4):760-3.

208. Kemper K, Grandela C, Medema JP. Molecular identification and targeting of colorectal cancer stem cells. *Oncotarget*. 2010 Oct;1(6):387-95
209. Glynne-Jones R, Wallace M, Livingstone JI, Meyrick-Thomas J. Complete clinical response after preoperative chemoradiation in rectal cancer: is a 'wait and see' policy justified? *Dis. Colon. Rectum* 2008; 51: 10–19.
210. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(17):1731–40.
211. Bosset JF, Collette L, Calais G, et al. Chemotherapy with pre-operative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(11):1114–23.
212. Guillem JG, Chessin DB, Cohen AM, et al. Long-term oncologic outcome following preoperative combined modality therapy and total mesorectal excision of locally advanced rectal cancer. *Ann Surg*. 2005;241(5):829–36; discussion 836–8.
213. Surawicz TS, Davis F, Freels S et al. Brain tumor survival: results from the National Cancer Data Base. *J. Neurooncol*. 1998; 40: 151–60
214. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP, and Stassi G. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 389-402
215. Cammareri P, Scopelliti A, Todaro M, Eterno V, Francescangeli F, Moyer MP, Agrusa A, Dieli F, Zeuner A, and Stassi G. Aurora-A Is Essential for the Tumorigenic Capacity and Chemoresistance of Colorectal Cancer Stem Cells. *Cancer Research* 2010; 70: 4655-4665
216. Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol* 2008;26:2828–2838.