

Espressione di FEZ1 in carcinomi mammari primitivi

Sono stati selezionati 457 pazienti con diagnosi documentata di carcinoma mammario (CM), con tessuto tumorale proveniente dal tumore primario disponibile per analisi immunohistochimica, con lesioni neoplastiche > 10 mm alla CT spirale, con storia clinica completa e follow-up disponibili. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti.

Nei campioni selezionati abbiamo esaminato il livello di espressione di FEZ1 in 441 preparati istologici di carcinoma mammario (CM) (più 16 controlli positivi) mediante l'utilizzo di "tissue micro-array". Ciascun caso, classificato secondo il particolare istotipo, è corredato di storia clinica, eventuale terapia somministrata e follow-up.

Il 100% (16/16) dei tessuti mammari normali ha mostrato positività per l'espressione di FEZ1. Il 54,7% (241/441) dei casi esaminati è negativo per FEZ1, nel 19% (84/441) dei casi si osserva un'espressione moderata, mentre soltanto il 26,3% (116/441) mostra una diffusa positività per FEZ1, con differenze significative tra i vari istotipi. In particolare, i 340 casi di carcinoma duttale infiltrante risultano per il 55,38% (188/340) negativi, per il 20,80% (71/340) moderatamente positivi e per il 23,82% (81/340) positivi; i 21 casi di carcinoma tubulare infiltrante sono per il 47,60% negativi (10/21), per il 4,80% (1/21) moderatamente positivi e per il 47,60% (10/21) positivi; i 15 casi di carcinoma midollare sono per il 46,66% (7/15) negativi, per il 20% (3/15) moderatamente positivi e per il 33,33% (5/15) positivi; i 4 casi di carcinoma mucinoso sono per il 25% (1/4) negativi e per il 75% (3/4) positivi; i 4 casi di carcinoma cribriforme sono per il 75% (3/4) negativi e per il 25% (1/4) positivi; i 38 casi di carcinoma lobulare infiltrante sono per il 63,15% (24/38) negativi, per il 15,80% (6/38) moderatamente positivi e per il 21,05% (8/38) positivi; i 13 casi di carcinoma misto duttale/lobulare sono per il 54% (7/13) negativi, per il 23% (3/13) moderatamente positivi e per il 23% (3/13) positivi; i 3 casi di carcinoma tubulo-lobulare sono per il 33% (1/3) negativi e per il 66,6% (2/3) positivi; infine i 3 casi di carcinoma micropapillare sono per il 100% (3/3) positivi.

E' evidente che l'alterazione dell'espressione di FEZ1 è strettamente associata ai diversi tipi di carcinoma mammario: utilizzando il test del χ^2 abbiamo individuato un'associazione statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra l'assenza di Fez1 e i vari istotipi esaminati.

Meccanismi molecolari alla base della resistenza al taxolo in cellule derivate da carcinomi mammari in cui FEZ1 è perso

Generazione del clone stabile in cellule derivate da carcinoma mammario (MCF-7) negative per FEZ1. Per generare un clone stabile in questa linea cellulare abbiamo utilizzato un sistema basato sul repressore Tet di *E. Coli* (TetR) che controlla negativamente i geni dell'operon sul transposone Tn 10. TetR blocca la trascrizione di tali geni legandosi alle sequenze dell'operatore Tet (TetO) in assenza di tetraciclina.

Le cellule MCF-7 FEZ1 +/+ e -/-, ottenute come sopra descritto sono state trattate con Taxolo dissolto in dimetilsulfoxide (Sigma, St.Louis, Missouri, USA) in mezzo completo per 6,12,18,24,48,72 ore a differenti concentrazioni (0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM). La concentrazione finale di dimetilsulfoxide è stata mantenuta al di sotto di 0.05% così da non esercitare un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare. Ad ogni time-point le cellule sono state tripsinizzate e contate usando un emocitometro. Per saggiare la chemiosensibilità al taxolo dei cloni FEZ1 positivi è stato utilizzato un MTS-assay ed un electron coupling reagent (PMS), specificatamente il "Cell Titer 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay kit" (Promega). Questi esperimenti hanno dimostrato come la presenza di Fez1 determini una maggiore sensibilità al Taxolo.

Studio dei meccanismi molecolari alla base della resistenza al Taxolo in cellule in cui il gene FEZ1/LZTS1 non è funzionante

Per comprendere quali siano i meccanismi di funzionamento del gene *FEZ1/LZTS1* (di seguito LZTS1) e la loro implicazione nella resistenza ai Taxani abbiamo utilizzato un modello murino in cui il gene *LZTS1* è stato inattivato nella linea germinale (Topo Knock-out) ed abbiamo utilizzato cellule derivate dai vari genotipi ottenuti per le analisi molecolari. Attraverso questi studi, riassunti in questo report,

siamo stati in grado di identificare i meccanismi molecolari attraverso i quali *Lzts1* potrebbe interferire con l'azione dei Taxani. Infatti, abbiamo osservato che la perdita di questa proteina altera la divisione mitotica rendendo inefficace l'azione di questi farmaci.

Generazione del modello murino

Per identificare il locus cromosomico murino del gene *LZTS1*, abbiamo analizzato una libreria di DNA genomico murino derivata dal ceppo 129/Sv, utilizzando come sonda il cDNA murino del gene. Una volta identificata la regione genomica questa è stata utilizzata per la generazione di un vettore di targeting, che dopo essere stato linearizzato, è stato trasferito tramite elettroporazione in cellule embrionali staminali murine che sono state selezionate tramite l'utilizzo di geneticina (G418). Successivamente le cellule positive sono state trasferite nella blastocisti di topi del ceppo C57BL/6J e quindi in utero di femmine pseudo-gravide, per la generazione di topi chimerici dando luogo a tre genotipi (+/+, +/- e -/-). La progenie ottenuta è stata osservata per 24 mesi. In animali con un'età compresa tra 8 e 24 mesi, l'esame istologico ha messo in evidenza che 0 topi su 11 con genotipo omozigote wild-type (+/+), 12 topi su 20 con genotipo eterozigote (+/-) e 9 topi su 9 con genotipo omozigote knock-out (-/-) sviluppavano tumori in diversi organi (Fig.1 E-I). I tumori più frequenti erano tumori mammari, con prevalente differenziazione duttale, carcinomi epatici e tumori dei tessuti molli (sarcomi).

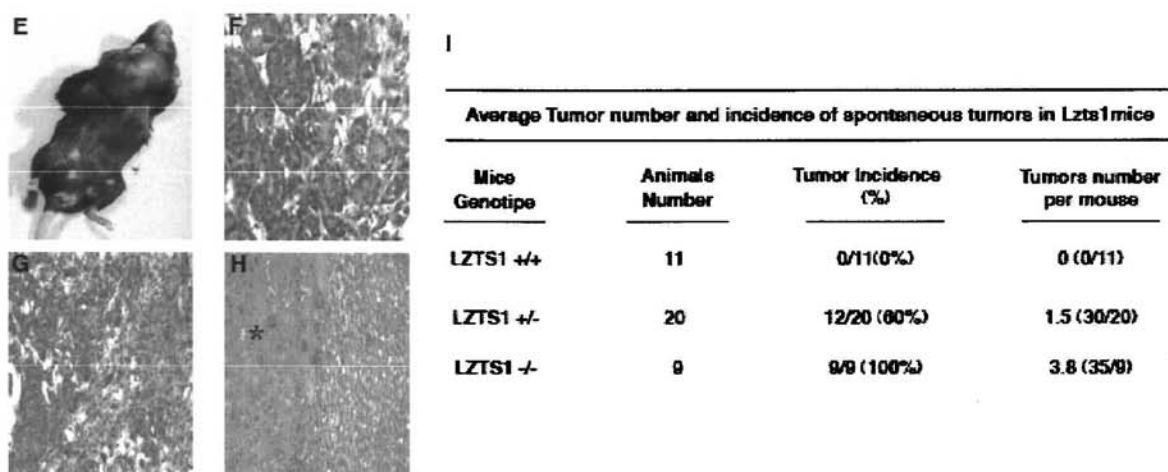


Figura 1. Sviluppo di tumori spontanei nei vari genotipi LZTS1. E. Aspetto macroscopico di tumore mammario in un topo *Lzts1* -/-. F. Ematossilina e Eosina, che mette in evidenza la struttura duttale del carcinoma mammario descritto in E. G. Sarcoma della coscia. H. Epatocarcinoma. I. Tabella riassuntiva dei tumori e della loro frequenza nei vari genotipi.

Studio delle cellule derivate da topi omozigoti wild-type e omozigoti Knock-out per *Lzts1*

I nostri precedenti studi avevano messo in evidenza come *Lzts1* fosse implicato nel controllo e nella progressione del ciclo cellulare. Per verificare il meccanismo di funzionamento di questo gene abbiamo derivato dai topi generati, come sopra descritto, fibroblasti embrionali murini (di seguito MEF) e ne abbiamo studiato le caratteristiche che vengono di seguito riassunte:

1. Crescita dei MEFs derivati dai Ko più lenta per incremento di apoptosi spontanea (Fig. 2A)
2. Normale transizione attraverso le fasi G1-S e S-G2 del ciclo cellulare (Fig. 2B)
3. Ridotta accumulazione delle cellule -/- rispetto alle +/+ nella fase G2/M del ciclo cellulare dopo sincronizzazione in doppio blocco di Timidina. (Fig. 2C)

Queste caratteristiche suggeriscono due ipotesi: 1) Le cellule $-/-$ hanno una progressione più lenta tra la fase S e la fase G2; 2) Le cellule $-/-$ hanno una uscita dalla fase M più veloce.

Per comprendere quale ipotesi fosse quella reale le cellule $+/+$ e $-/-$ sono state cresciute in presenza di 5'-bromodeossiridina (BrdU), in modo da marcare la fase S. Dopo aver rimosso la BrdU abbiamo aggiunto Nocodazolo, un farmaco che blocca le cellule in prometafase e abbiamo raccolto le cellule dopo 3, 12 e 18 ore. Come mostrato in Figura 3A l'analisi per FACS ha messo in evidenza che le cellule $-/-$ positive per BrdU progrediscono normalmente dalla fase S alla fase G2/M ma si accumulano meno in prometafase (Fig. 3A). Infatti dopo 12-18 ore di trattamento con il nocodazolo il 10% delle cellule $+/+$ contro il 25% di cellule $-/-$ erano nella fase G1/S suggerendo che le cellule Ko uscivano più velocemente dalla mitosi.

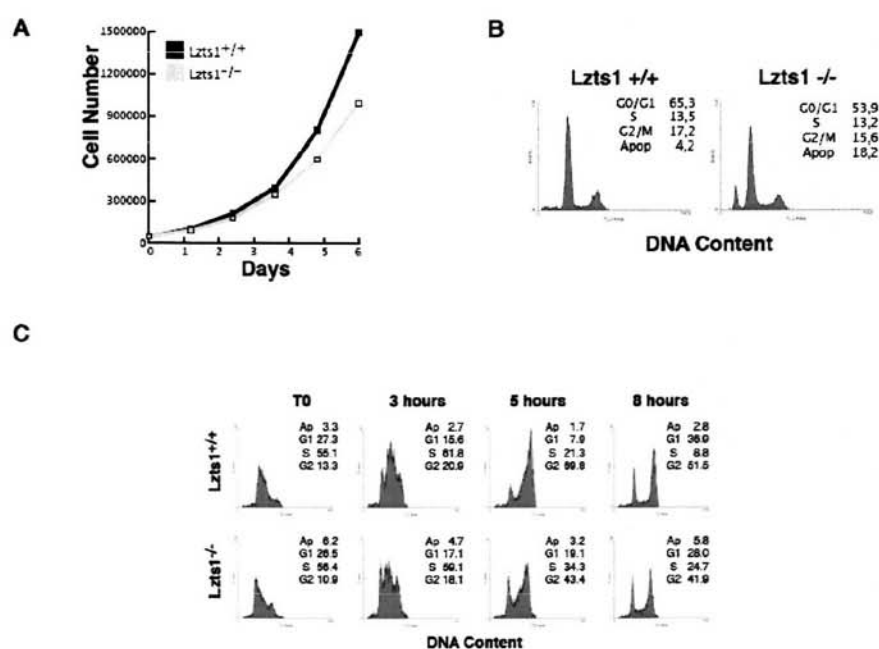


Figura 2. Caratteristiche dei MEF. **A.** Curve di crescita in cui sono comparate cellule $+/+$ (box neri) e cellule $-/-$ (box grigi). **B.** Analisi FACS delle cellule come in **A.** **C.** Analisi FACS delle cellule $+/+$ e $-/-$ sincronizzate nella fase G1/S attraverso doppio blocco in Timidina e rilasciate per i tempi indicati.

Per studiare in maggior dettaglio il ruolo di Lzts1 nella progressione mitotica abbiamo analizzato le cellule wild-type e knock-out per l'espressione della fosfoproteina MPM2 e nella loro distribuzione lungo le fasi del ciclo cellulare. Per fare questo abbiamo isolato, tramite mitotic shake-off un uguale quantità di cellule Wt e Ko (Fig. 3B). L'analisi del contenuto di DNA (Fig.3C) e dell'espressione della fosfoproteina MPM2 (Fig.3D) ha messo in evidenza che le cellule Wt arrestate in prometaphase con il Nocodazolo completano la fase M in 90 minuti mentre le cellule Ko in 60 minuti. Dati che suggeriscono una fase mitotica più veloce nelle cellule Ko.

Una volta stabilito che l'assenza di Lzts1 interessa principalmente la transizione tra profase ed anafase abbiamo esplorato quali ne fossero gli effetti sull'attività di CDK1 durante la fase M. Attraverso numerosi esperimenti abbiamo verificato che l'assenza di Lzts1 correla con una ridotta attività chinastica di Cdk1 che causa una riduzione della durata della fase M accompagnata ad un incremento di cromosomi mal segregati (Fig.3E).

Studio di cellule derivate da carcinomi mammari primitivi attraverso l'utilizzo di small-interference RNA (Si-RNA)

Per validare i dati ottenuti nello studio del modello murino abbiamo utilizzato cellule primarie derivate da carcinomi mammari.

Derivazione di cellule primarie da carcinoma mammario

Per ottenere cellule derivate da carcinoma mammario abbiamo utilizzato il metodo di Lasfargues.

Da carcinomi mammari (n.135) inviati al nostro dipartimento di anatomia patologica per esami di routine è stato prelevato a fresco un frammento di tessuto neoplastico. Il tessuto è stato immediatamente immerso in mezzo di cultura, il MCDB 170 secondo il protocollo di Hammond, Ham e Stampfer, acquistato dalla GIBCO e supplementato con Pennicillina (1.5IU/ml), Streptomicina (1.5µg/ml), Insulina (5µg/ml), Idrocortisone (1.4×10^{-7} M), EGF (10ng/ml), Etanolamina (1.0×10^{-4} M), Trasferrina (5µg/ml), Prolattina Ovina (1µg/ml) e Prostaglandina E₁ (2.5×10^{-8} M). In tutti i casi (135) il rimanente tessuto è stato fissato in formalina per stabilire la quantità e l'istotipo del tumore messo in cultura.

Per verificare che ogni cultura cellulare fosse in realtà costituita da cellule epiteliali, abbiamo utilizzato un approccio immunocitochimico tramite utilizzo di anticorpo per Pan Citocheratina e per antigene epiteliale di membrana (EMA). A maggior conferma della natura delle cellule è stata eseguita microscopia elettronica. Da 135 tumori analizzati abbiamo ricavato 5 linee cellulari, che presentavano il 100% delle cellule positive per citocheratina ed EMA. Da un punto di vista morfologico tutte le linee ottenute presentavano caratteri di malignità (pleomorfismo cellulare, inversione del rapporto nucleo/citoplasma, elevata attività mitotica e crescita in sospensione).

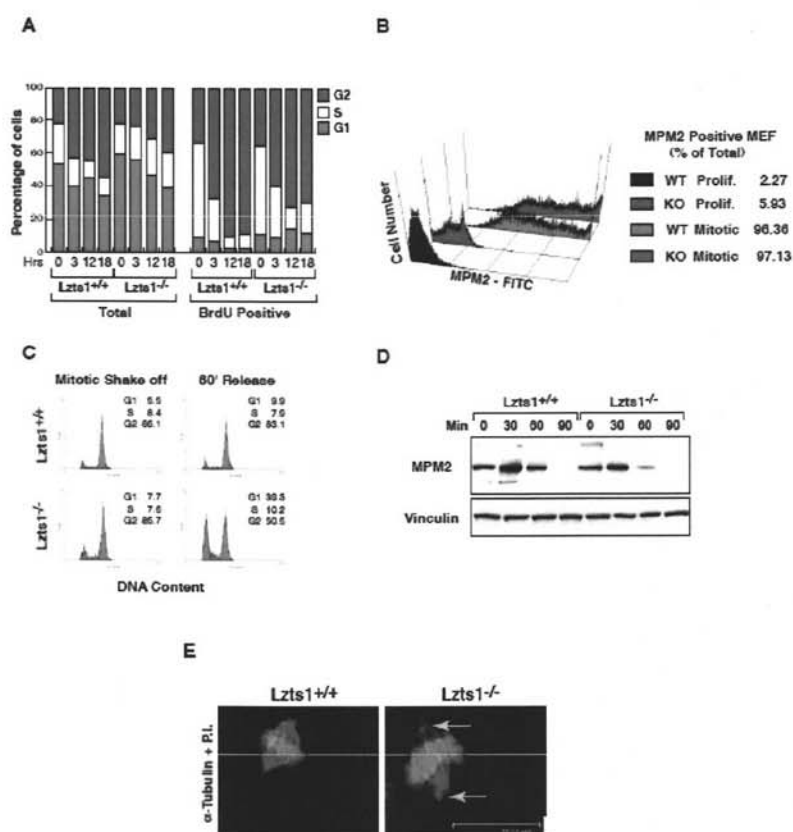


Figura 3. A. Studio della fase S in cellule marcate con BrdU. **B.** Espressione della fosfoproteina MPM2 in cellule ciclanti ed isolate per mitotic shake-off nei due genotipi. **C.** Analisi FACS delle cellule isolate per mitotic shake-off e rilasciate per 60 minuti. **D.** Analisi della fosfoproteina MPM2 in cellule isolate per mitotic shake-off e rilasciate per i tempi indicati. **E.** Studio della divisione mitotica in cellule +/+ e -/-. I cromosomi mal segregati sono indicati dalle frecce gialle.

Determinazione dell'espressione del gene LZTS1 nelle cellule primarie derivate da carcinoma mammario

La determinazione della espressione proteica di LZTS1 nelle cellule ottenute al punto precedente abbiamo utilizzato tecniche standard di Western-blot, impiegando un nuovo anticorpo monoclonale da noi

generato. Come mostrato in figura 3 due delle cinque linee generate non mostravano l'espressione del gene (Fig3).

Inibizione dell'espressione del gene LZTS1 tramite l'utilizzo di si-RNA

Per verificare quale fosse l'effetto della perdita di espressione di LZTS1 in culture primarie di carcinoma mammario abbiamo utilizzato si-RNA.

L'RNA interference è un processo biologico in cui l'introduzione di un RNA a doppio filamento determina la degradazione di un RNA complementare portando quindi a silenziamento genico.

Per sopprimere l'espressione del gene abbiamo utilizzato dei custom-design si-RNA acquistati presso la Qiagen. Come mezzo di trasfezione è stato utilizzato HiPerfect come da istruzioni del produttore. A 24 ore dopo la trasfezione le cellule sono state staccate e le proteine estratte come da protocolli standard. L'analisi dell'effetto di soppressione è stata eseguita tramite tecniche convenzionali di western-blot. L'utilizzo combinato di due si-RNA a 24hrs dopo la trasfezione determina una scomparsa totale della espressione proteica.

Determinazione degli effetti del Taxolo in cellule in cui l'espressione di LZTS1 è stata inibita.

Le cellule primarie, ottenute come sopra descritto sono state trattate con Taxolo coniugato con un fluorocromo dissolto in dimetilsulfossido (Sigma, St.Louis, Missouri, USA) in mezzo completo per 24 ore ad una concentrazione di 1 nM. Le cellule sono state quindi fissate ed analizzate con un microscopio invertito con luce a fluorescenza. La mancata espressione di LZTS1 determina un mancato legame delle molecole di Taxolo alle strutture microtubulari determinando una colorazione diffusa nel citoplasma. Il meccanismo per il quale la mancanza di Lzts1 determina un anomalo legame delle molecole del taxano alla componente microtubulare sono in corso di definizione.

Pubblicazioni

- 1) H. Ishii, K. Mimori, Y. Yoshikawa, M. Mori, Y. Furukawa, A. Vecchione. Differential roles of E-type cyclins during transformation of murine E2F-1-deficient cells. *DNA and Cell Biology* 24:173-179, 2005.
- 2) Ishii H, Mimori K, Inageta T, Murakumo Y, Vecchione A, Mori M, Furukawa Y. Components of DNA Damage Checkpoint Pathway Regulate UV Exposure-Dependent Alterations of Gene Expression of FHIT and WWOX at Chromosome Fragile Sites. *Mol Cancer Res.* 3:130-138, 2005.
- 3) Vecchione A, Baldassarre G, Ishii H, Nicoloso MS, Belletti B, Petrocca F, Zanesi N, Fong LY, Battista S, Guarnieri D, Baffa R, Alder H, Farber JL, Donovan PJ, Croce CM. Fez1/Lzts1 Absence Impairs Cdk1/Cdc25C Interaction during Mitosis and Predisposes Mice to Cancer Development. *Cancer Cell.* 2007 Mar 13;11(3):275-289.
- 4) F. Petrocca, R. Visone, M. Rapazzotti Onelli, Manisha Shah, M.S. Nicoloso, I. De Martino, D. Iliopoulos E. Pilozzi, C.G LIU, M. Negrini, L. Cavazzini, S. Volinia, H. Alder, L.P Ruco, G. Baldassarre, C.M. Croce, A. Vecchione. E2F1-regulated MicroRNAs impair TGFβ-dependent cell cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 13:272-286, 2008.

**(III) LE CELLULE NEOPLASTICHE PRIMITIVE E I MECCANISMI ANTI-APOPTOTICI:
LE BASI CELLULARI DELLA FARMACORESISTENZA TUMORALE****U.O. 05 – Responsabile Scientifico:****Ruggero De Maria, ISS****U.O. 06 – Responsabili scientifici:****Carlo Croce, Ohio University, Columbus,
USA/ Cesare Peschle, ISS****Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 05 - Prof. Ruggero De Maria, Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, ISS**

Questa linea di ricerca del programma oncotecnologico si è proposta di isolare e caratterizzare le cellule staminali neoplastiche (CSCs) presenti in una serie di tumori solidi, con l'obiettivo di studiare i meccanismi cellulari e molecolari alla base della farmaco resistenza delle neoplasie. L'inefficacia delle terapie antineoplastiche e la tendenza a recidivare mostrate dalla maggioranza dei tumori potrebbero infatti essere dovute alla resistenza della popolazione staminale verso i trattamenti chemioterapici convenzionali. Pertanto, le cellule staminali tumorali rappresentano il bersaglio elettivo per nuovi farmaci ad azione mirata ed offrono un vantaggio potenzialmente rivoluzionario nel trattamento del cancro in quanto la loro eliminazione potrebbe portare all'eradicazione del tumore.

Nella prima fase della ricerca, la nostra attenzione si è focalizzata sui tumori cerebrali come il glioblastoma (GBM). Uno dei primi studi ha riguardato la chemiosensibilità delle CSCs isolate da GBM e l'identificazione in tali cellule dei possibili meccanismi di chemioresistenza. Abbiamo dimostrato che le cellule staminali di GBM mostrano una marcata resistenza ad un'ampia gamma di chemioterapici comunemente utilizzati in terapia ed abbiamo escluso la possibilità che questo sia dovuto ad una ridotta concentrazione intracellulare dei farmaci, imputabile ad un ridotto *uptake* o a meccanismi di estrusione attiva degli agenti somministrati (1). Parallelamente e sulla base di uno studio ultimato nel corso del primo anno di attività (2) relativo ai meccanismi molecolari di resistenza all'apoptosi in cellule staminali neurali (NSCs) abbiamo valutato l'effetto dell'infiammazione su tali cellule. In particolare abbiamo valutato l'ipotesi che le NSCs siano in grado di indurre apoptosi nelle cellule immunitarie infiltranti, in particolare linfociti T e monociti, attraverso un fenomeno conosciuto come immunoprivilegio. E' emerso che le citochine infiammatorie non solo sono prive di tossicità nei confronti delle NSCs, ma possono perfino favorire l'eliminazione di cellule del sistema immunitario. Le citochine infiammatorie TNF- α , IL-1 β e IFN- γ promuovono l'espressione di diversi ligandi di morte sulle NSCs, in particolare di TRAIL e TLA1. In esperimenti di co-coltura, le NSCs pretrattate con citochine infiammatorie si sono dimostrate efficaci nell'indurre apoptosi di cellule monocitarie, innescando l'attivazione di una serie di recettori di morte. Questi risultati (3) hanno evidenziato in particolare il ruolo del TNF- α nella citotossicità mediata dalle NSCs. L'importanza del microambiente ed in particolare delle citochine infiammatorie per le NSCs è stata evidenziata da un altro studio, nel quale abbiamo dimostrato che la combinazione di TNF- α , IL-1 β e IFN- γ è in grado di influenzare il fenotipo di NSCs murine inducendone il differenziamento verso la linea astrocitaria (4).

In linea con l'importanza che il microambiente esercita sul processo di differenziamento dei progenitori neurali, abbiamo dimostrato che anche le cellule staminali di GBM esibiscono un potenziale di differenziamento mesenchimale in modo del tutto analogo alle cellule staminali della cresta neurale. In generale, la cellula che dá origine ai tumori del cervello rimane oggetto di dibattito sebbene diverse evidenze sperimentali suggeriscano che l'evento di trasformazione neoplastica riguardi cellule staminali o progenitori neurali. Lo studio condotto (5) evidenzia l'esistenza di due classi di CSCs in questo tipo di tumore sulla base del loro potenziale differenziativo. Sulla base dei risultati ottenuti è possibile ipotizzare che almeno un gruppo di GBM derivi da una cellula staminale della cresta neurale che in appropriate condizioni ambientali possa esprimere la propria multipotenzialità, mentre negli altri casi la

cellula di origine sarebbe una cellula precursore più differenziata e “committed” verso il differenziamento astrocitario.

Infine, uno dei risultati più interessanti sul GBM, che conferma l'importanza di focalizzare l'attenzione sulla popolazione di cellule staminali in questo tumore, deriva da uno studio prospettico condotto su pazienti affetti da GBM, volto ad esplorare le potenzialità prognostiche delle CSCs (6). Abbiamo valutato la correlazione tra il potenziale di crescita *in vitro* delle CSCs isolate da 44 pazienti e la progressione della malattia. E' stato anche valutato il valore prognostico del marcatore di membrana CD133 e dell'indice proliferativo delle CSCs (Ki67). I risultati di tale analisi hanno indicato chiaramente che la generazione *in vitro* di CSCs e la coespressione di CD133 e Ki67 in tali cellule rappresentano fattori prognostici indipendenti significativi, suggerendo non solo che l'analisi delle CSCs può predire la sopravvivenza dei pazienti con GBM ma confermando il peso che tale sottopopolazione ha nel determinare il decorso della malattia, anche in considerazione dell'intrinseca resistenza di tali cellule ai trattamenti convenzionali.

Oltre alle ricerche condotte sul glioblastoma come descritto, l'attività di ricerca di questa U.O. a partire dal secondo anno si è focalizzata sui due tumori cosiddetti “big killer” cioè tumore del colon e del polmone. La scelta di questi tumori è stata dettata sia da valutazioni riguardanti l'elevata incidenza nella popolazione e gli alti tassi di mortalità dei pazienti affetti, sia dalla disponibilità di un numero sufficiente di reperti chirurgici grazie all'esistenza di collaborazioni con reparti ospedalieri di chirurgia oncologica. Per ciascuno dei due tumori scelti, l'obiettivo primario è stato quello di identificare all'interno della massa tumorale la sottopopolazione cellulare con caratteristiche di staminalità e tumorigenicità in animali da esperimento.

L'utilizzo di un marcatore come il CD133 per isolare la popolazione tumorigenica del carcinoma del colon si è rivelato determinante per portare a termine la ricerca iniziata. La possibilità di separare le cellule tumorali sulla base dell'espressione di tale marker ha consentito infatti di dimostrare la capacità tumorigenica di tale sottopopolazione, che rappresenta circa il 2,5% di tutta la popolazione tumorale, mediante esperimenti *in vivo* su topi immunocompromessi (SCID). Le cellule CD133+ sono state inoculate sottocute e dopo un periodo di tempo compreso tra le 4 e le 8 settimane hanno dato origine a tumori istologicamente molto simili a quelli del paziente. Abbiamo dimostrato che una quantità minima pari a 3000 cellule CD133+ è in grado di generare un tumore in topi SCID in contrapposizione ad inoculi fino a 10^5 cellule CD133- o a 10^6 cellule tumorali non separate che non hanno dato origine a tumore nell'animale (7). Lo stesso marcatore si è dimostrato efficace per l'isolamento di una rara popolazione di cellule tumorigeniche con caratteristiche di staminalità anche in diversi sottotipi di tumore di polmone (SCC, AC, LCNEC e SCLC), che nessun altro gruppo di ricerca è riuscito ad isolare ad oggi. In modo analogo al carcinoma di colon, abbiamo determinato la quantità minima di cellule CD133+ in grado di generare un tumore fenotipicamente identico al tumore primario in topi SCID, che per tutti i tipi istologici in esame è pari a 10^4 cellule (8). I risultati di questi esperimenti sono riassunti nella Figura 1a per il tumore al colon e 1b per il carcinoma al polmone.

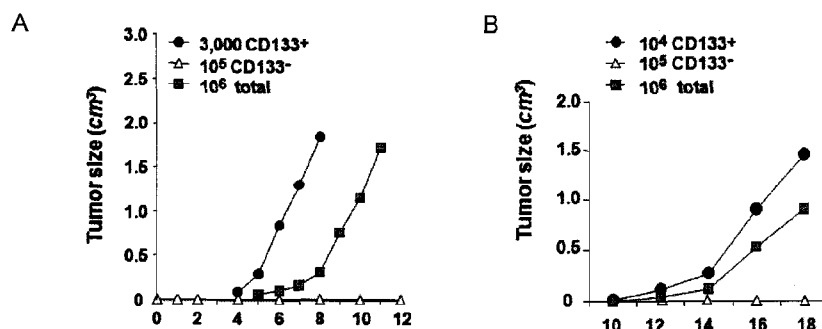


Figura 1. Analisi del potenziale tumorigenico delle cellule CD133+, CD133- e delle cellule tumorali totali ottenute a partire da campioni umani di (a) tumore del colon e (b) del polmone, in seguito ad inoculo sottocutaneo in topi immuno-compromessi. I dati riguardanti il volume dei tumori generati rappresentano la media di cinque esperimenti effettuati in triplicato.

