



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Franca Deriu

INDIRIZZO IN FISIOLOGIA, FARMACOLOGIA, MORFOLOGIA E
FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO

Responsabile di Indirizzo: Prof. Eusebio Tolu

XXVI CICLO

MOLECULAR AND ULTRA-STRUCTURAL INSIGHT INTO THE ENRICHMENT OF GLIOBLASTOMA AND NEUROBLASTOMA STEM-LIKE CELLS

Direttore della Scuola:
Prof.ssa Franca Deriu

Tesi di dottorato di:
Dott. Cristiano Farace

Tutor:
Prof. Roberto Madeddu

Co-tutor:
Prof. José Carlos Prados Salazar

Dott. Pablo J Alvarez

Anno Accademico 2012 – 2013

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2010/2011 – XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 ed in collaborazione con l'Università degli studi di Granada, in cui il dottorando ha svolto parte del percorso di tesi.

A mia madre e mio padre

Abstract

The increasing evidences in favor to the “hierarchical model of the cancer” and remarkable matches in genomic traits/expression profiles between stem 3-D spheroid cultures and cancer *in vivo*, allow investigators to assess new biological marks of cancer and oncogenic/metastatic-related genes *in vitro*. It is possible manipulating only a subset of cells, isolated or induced, that show stem-like properties with high differentiation potential, plasticity and widespread molecular/cellular heterogeneity. These properties, together with cancer micro-environment, immune evasion, and the ability to form metastasis, are thought to be actually the main hallmarks of malignant cancer. Cancer stem cells (CSC) play a significant role in tumor formation, metastasis, resistance to anticancer therapies and cancer recurrence. Indeed, cancer cells require stem-like phenotype, through epithelial to mesenchymal transition (EMT) and viceversa (MET), to gain migratory capacity and to induce metastasis *in vivo*. Methodologically, spheroid cultures in conditioned serum-free media, a powerful system to enrich primary or established cell lines in CSC, resemble with high similarity to the tumor of origin. The aim of the thesis was to characterize at ultrastructural, functional and molecular level, the induction of stem-like phenotypes in two human Glioblastoma and Neuroblastoma established cell lines. CSC induction and characterization, both in suspension and in bi-layered soft agar, temozolomide (TMZ) treatments, and TEM/SEM microscopy of the spheres were performed. In addition, human chip microarray-based comparative gene expression analysis, and real time qRT-PCR/western blot of two selected genes/protein were conducted. The high 3D spheres generation in serum-free medium and the more elevated TMZ resistance of single cells from neurospheres dissociation, rather than their adherent counterparts, suggest a good response of the cell lines to SFM. Microarray hybridization, qRT-PCR and western blotting analysis reveal a notable enhancement in mRNA and protein expression of the extracellular matrix (ECM)-related small-leucine-rich proteoglycans (SLRPs) decorin and lumican in

neurospheres. Moreover, a 70kDa lumican, corresponding to its glycoprotein arrangement, was strongly expressed in neurospheres, suggesting a crucial role of this protein in sphere generation, maintenance and cell migration.

The general SLRPs signature in both GBM and NBL neurospheres led to retain that cancer stem-like cells may conserve the ability to modulate the surrounding microenvironment, by inducing these ECM proteins known for their involvement in collagen fibers regulation, growth factor stocking and in many signaling pathways (proliferation, cell migration, differentiation, ecc) via regulation of tyrosin-chinase receptors. These findings postulate a potential role of SLRPs in the modulation of stem and cancer-related pathways and further functional studies are needed to better understand their role in oncogenesis. Moreover, clinical evaluations of SLRPs in GBM and NBL patients, could lead to uncover their potential as clinical tools.

Keywords: cancer stem cell (CSC); epithelial-mesenchymal transition (EMT); Glioblastoma multiforme (GBM); Neuroblastoma (NBL); decorin (DCN); lumican (LUM); neurospheres; temozolomide (TMZ); tumor micro-environment

Indice

I. INTRODUZIONE.....	- 1 -
TUMORI DEL SISTEMA NERVOSO	- 6 -
<i>Glioblastoma Multiforme</i>	- 7 -
<i>Neuroblastoma (NBL)</i>	- 9 -
TEORIA DELLE CANCER STEM CELLS (CSC) E PROPRIETÀ DEI TUMORI MALIGNI	- 13 -
<i>Modello gerarchico di iniziazione e propagazione dei tumori</i>	- 13 -
<i>Transizione epiteliale-mesenchimale e cancro</i>	- 17 -
<i>Eterogeneità cellulare, micro-ambiente tumorale e staminalità</i>	- 19 -
CSC E CELLULE PROGENITRICI STEM-LIKE NEI TUMORI AGGRESSIVI.....	- 23 -
<i>Proprietà e vie di segnalazione delle CSC</i>	- 23 -
<i>Sfere tumorali 3-D come modello di espansione staminale</i>	- 25 -
<i>Marcatori di staminalità</i>	- 28 -
II. SCOPO DELLA TESI	- 31 -
OBBIETTIVI	- 32 -
WORK-FLOW DEL PROGETTO	- 33 -
III. MATERIALI E METODI	- 35 -
COLTURE CELLULARI	- 36 -
<i>Linee cellulari umane SK-N-SH di Neuroblastoma e SF-268 di</i> <i>Glioblastoma e crescita in condizioni di aderenza</i>	- 36 -
<i>Arricchimento delle linee SK-N-SH e SF-268 in cellule</i> <i>staminali/progenitrici tumorali attraverso la generazione di sfere 3-D in</i> <i>NSC SFM</i>	- 37 -
<i>Crescita in soft agar</i>	- 38 -
CARATTERIZZAZIONE ULTRASTRUTTURALE E FUNZIONALE	- 40 -
<i>Microscopia ottica</i>	- 40 -
<i>Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)</i>	- 40 -
<i>Microscopia elettronica a scansione (SEM)</i>	- 41 -
<i>Trattamento con Temozolomide e saggio MTT</i>	- 41 -
ANALISI MOLECOLARI	- 43 -
<i>Estrazione dell'RNA e reazione di retrotrascrizione</i>	- 43 -
<i>Chip Microarray Affymetrix</i>	- 43 -
<i>RT-PCR</i>	- 44 -
<i>Real Time PCR quantitativa con doppio housekeeping (qRT-PCR)</i>	- 45 -

<i>Western Blot</i>	- 47 -
<i>Analisi dei dati</i>	- 48 -
IV. RISULTATI	- 49 -
LINEE SK-N-SH ED SF-268 GENERANO NEUROSFERE 3-D IN NSC SFM IN MEZZI LIQUIDI E SEMI-SOLIDI.....	- 50 -
ANALISI ULTRASTRUTTURALE E MORFO-FUNZIONALE	- 55 -
ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA	- 63 -
<i>Screen del trascrittoma delle sfere mediante Chip Microarray</i>	- 63 -
<i>Aumento tempo-dipendente di DCN e LUM in sfere 3-D mediante Real Time qRT-PCR</i>	- 68 -
<i>Isoforme differenti di LUM in relazione al tempo di induzione</i>	- 72 -
V. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	- 74 -
VI. BIBLIOGRAFIA	- 86 -

I. INTRODUZIONE

Recentemente, il concetto di staminalità ha assunto un valore traslazionale di primaria importanza in vari campi della ricerca biomedica, di base e applicata, dalla classica embriologia e biologia dello sviluppo alla medicina rigenerativa, dall'oncologia molecolare alla medicina personalizzata.

La rigenerazione cellulare e tissutale del sistema nervoso (SN) è stata a lungo oggetto di studi ed, erroneamente, ha resistito per tanti anni il dogma per cui le cellule nervose dell'individuo adulto non siano in grado di replicare. Le scoperte nel corso degli ultimi 50 anni affermano tutt'altro; è noto infatti che anche i tessuti nervosi ed i neuroni possono rigenerarsi nell'adulto [1], a partire da cellule staminali e progenitrici neuronali e gliali [2].

Le cellule staminali nei tessuti adulti (ASC) rappresentano una minoritaria popolazione di cellule longeve del grado più elevato dell'organizzazione gerarchica dei tessuti. La longevità delle ASC è determinata dal preponderante stato di quiescenza in cui si trovano, all'interno di nicchie specializzate che ne favoriscono il mantenimento cellulare. Queste cellule, come le cellule staminali embrionali (ESC), sono caratterizzate da estensivo auto-rinnovamento (*self-renewal*), ampio potenziale di differenziazione ed, in relazione ad un favorevole micro-ambiente circostante, significativa capacità proliferativa. Nel sistema nervoso sono state identificate cellule con proprietà staminali (NSC), organizzate in specifiche linee gerarchiche che, almeno potenzialmente, potrebbero rigenerare l'intero tessuto. Queste cellule, risiedono all'interno di nicchie specializzate che ne garantiscono il mantenimento e risiedono tipicamente nei siti anatomici atti alla neurogenesi, ossia zona sub-ventricolare (SVZ) dei ventricoli laterali e zona sub-granulare (SGZ) dell'ippocampo. Sia fisiologicamente che in seguito ad un danno al sistema nervoso, le NSC possono migrare dalle nicchie in cui risiedono e raggiungere i siti in cui andranno a differenziarsi per costituire e/o sostituire i tessuti. Le ASC, allontanandosi spazialmente dalla nicchia, percorrono nuovi spazi e vanno incontro a differenziazione tessuto-specifica, attraverso l'interazione con un micro-ambiente favorevole e determinante, risultante in una attivazione di vie di segnalazione molecolari da parte di citochine e fattori di crescita presenti nella matrice extracellulare (ECM).

Nella ricerca applicata alle malattie neuro-degenerative, una delle missioni della medicina rigenerativa è quella di stimolare la rigenerazione e la riparazione del tessuto nervoso, attraverso trapianto autologo di staminali neurali e stimolazione delle NSC endogene, coadiuvato da farmaci che favoriscono la neuro-genesi. Il razionale è quello di ricapitolare nell' area lesionata un mix adeguato di cellule staminali, segnali trofici e di regolazione che sono in grado di rallentare la degenerazione, stimolare la plasticità neurale e ricreare un micro-ambiente ideale.

Viceversa, in area neuro-oncologica, recenti scoperte hanno rilevato la staminalità come caratteristica fondamentale dei tumori maligni. Come può accadere in qualsiasi cellula somatica differenziata, anche le cellule staminali e le cellule progenitrici dei tessuti adulti possono accumulare aberrazioni cromosomiche e mutazioni geniche che le rendono tumorali [3]. Ma, avendo proprietà staminali o staminali-simili, a differenza delle prime, occupano i gradi più elevati dell'organizzazione gerarchica del tessuto (in questo caso della neoplasia); concettualmente, questa differenza si traduce in uno scenario in cui la quasi totalità delle cellule presenti nella massa tumorale deriva necessariamente da cellule indifferenziate mutate che, al momento della loro espansione, possedevano proprietà staminali. Queste cellule staminali tumorali (CSC), chiamate anche "cellule iniziatrici il tumore" (TIC), essendo capaci di auto-rinnovarsi e di differenziarsi, sono in grado di trasmettere l'informazione genetica alla loro progenie, destinata a divenire eterogenea, composta da altre cellule staminali tumorali e cellule differenziate con scarse proprietà staminali (la maggior parte delle cellule tumorali). La progenie staminale potrà acquisire ulteriori modificazioni genetiche e, replicando, potrà originare ulteriori linee staminali e differenziate. Da questa prospettiva, le cellule staminali tumorali rappresentano il nucleo di insorgenza e propagazione del tumore; dal nucleo staminale mutato si genera una progenie maligna eterogenea che, invadendo i tessuti limitrofi, andrà a costituire la massa tumorale. Forti evidenze suggeriscono che le CSC hanno un potenziale oncogenico elevato a differenza delle altre cellule differenziate. Inoltre numerosi autori riportano una

maggiore resistenza ai farmaci chemioterapici da parte delle stesse. Sperimentalmente, le CSC sono le *uniche* cellule in grado di propagare il tumore nelle colture *in vitro* ed in seguito a xenotrapianti seriali in modelli *in vivo*. Da un punto di vista clinico, questa proprietà si declina in una maggiore resistenza delle CSC nei confronti dei farmaci chemioterapici ed in una maggiore ricorrenza di tumori secondari recidivanti, in pazienti previamente sottoposti a trattamento terapeutico convenzionale.

Fisiologicamente, non tutte le cellule di un organo hanno lo stesso potenziale staminale; similmente, non tutte le cellule tumorali di una stessa massa hanno lo stesso potenziale oncogenico - cioè la stessa capacità di formare tumori - facendo in tal modo supporre un'organizzazione cellulare gerarchica anche in termini di oncogenicità. Questa assunzione metterebbe in stretta relazione la staminalità e l'oncogenicità, e questo è stato parzialmente chiarito da numerose scoperte inerenti la concordanza tra le vie di segnalazione che regolano *self-renewal* e differenziazione delle ESC e delle ASC durante la neurogenesi ed i *pathway* molecolari delle cellule tumorali attivi durante l'oncogenesi [4-6].

Con queste premesse ed in seguito ad una serie di evidenze cliniche e sperimentali, è stata proposta la Teoria Staminale dei Tumori, dall'inglese "The Cancer Stem Cells Theory" (Teoria delle CSC). Le basi teoriche della visione tradizionalista del cancro ed i concetti chiave ad essa correlati (trasformazione maligna, oncogenicità, razionale terapeutico, ecc), sono state recentemente riconsiderate alla luce delle scoperte inerenti la biologia molecolare ed i tratti morfo-funzionali di cellule staminali rinvenute in masse tumorali (CSC-like) e circolanti attraverso i vasi sanguigni (CTSC).

Da questo punto di vista, l'impatto del modello staminale sugli attuali standard terapeutici è inevitabile e le applicazioni terapeutiche derivabili dalla nuova concezione sono talmente rilevanti e promettenti che anche l'American Association of Cancer Research, in un suo workshop sul tema nel 2006, ne ha tracciato basi teorico-scientifiche e linee guida per il futuro [7]. Infatti, se si assume l'esistenza di un'organizzazione gerarchica delle cellule in relazione al micro-ambiente tumorale, si aprono di riflesso nuovi scenari in

cui l'oncologia molecolare, servendosi delle nuove bio-tecnologie farmaceutiche e delle promettenti applicazioni della *nanomedicina*, mira ad elaborare nuove strategie terapeutiche nel tentativo di eradicare selettivamente le CSC e promuovere la degenerazione della neoplasia, privandola del suo nucleo di insorgenza, propagazione e farmaco-resistenza. Per cui, se da un lato la medicina rigenerativa ha lo scopo di rinforzare le cellule staminali dei tessuti lesionati o degenerati, l'oncologia molecolare orientata sulla teoria staminale del cancro si pone come obiettivo primario quello di approfondire la biologia delle cellule staminali tumorali, ed il modello che ne sta alla base, con lo scopo di sviluppare azioni mirate ad eradicare la vera forza motrice del fenomeno cancro.

In relazione a ciò, una più profonda comprensione dei meccanismi molecolari che regolano l'auto-rinnovamento delle cellule CSC offre senza dubbio un contributo nuovo ed originale nella ricerca di nuovi marker utili nella caratterizzazione molecolare e funzionale tessuto-specifica e nello sviluppo di farmaci mirati per strategie antitumorali maggiormente efficaci.

Tumori del sistema nervoso

Nello studio delle neoplasie del sistema nervoso (NS), è utile sottolineare che non tutti i tumori cerebrali sono a carico del tessuto nervoso, e che non tutti i tumori dei tessuti nervosi risiedono nell'asse encefalo-midollo. Infatti, oltre a racchiudere i tumori neuro-epiteliali primari e metastatici del sistema nervoso centrale (CNS) (astrocitoma, oligodendrocitoma, ependimoma, ecc), le neoplasie del SN includono anche meningiomi, linfomi, cisti aracnoidee, gliomi del nervo ottico e lesioni tumorali della guaina mielinica a carico delle cellule di Schwann.

Con l'emergere della teoria staminale del cancro, è stato rivisitato il meccanismo di insorgenza e di propagazione di molti tumori del sistema nervoso. Per questo motivo, la comunità scientifica ha intrapreso negli ultimi 30 anni una serie di azioni volte ad una maggiore comprensione e considerazione dei tumori "stem-like", come ad esempio i tumori primitivi neuro-ectodermici (PNET), i tumori embrionali ed i tumori delle cellule progenitrici (blastomi). Nel Glioblastoma multiforme e nel Neuroblastoma, le popolazioni coinvolte nell'oncogenesi comprendono glioblasti e neuroblasti rispettivamente. L'elevato potenziale clonogenico e la continua proliferazione di precursori indifferenziati con proprietà *stem-like* anche in età adulta, rendono queste forme tumorali estremamente maligne e maggiormente inclini a fenomeni metastatici e di invasività.

Attualmente non vi è una cura efficace nel trattamento del Glioblastoma multiforme e del Neuroblastoma ad alto rischio e nella quasi totalità dei casi la prognosi risulta infausta, con tempo di sopravvivenza dei pazienti inferiore ai 5 anni. Il fallimento del trattamento con farmaci antineoplastici è determinato da una serie di fattori riconducibili in buona parte alla natura staminale del tumore, fra cui basso tasso di replicazione e maggiore capacità migratoria ed invasiva delle CSC, eterogeneità del tumore ed interazioni con il micro-ambiente tumorale, espressione di geni di riparazione del DNA,

trasportatori *ATP-binding cassette* (ABC) e vie di segnalazione anti-apoptotiche che stimolano l'auto-rinnovamento cellulare [8-12].

Glioblastoma Multiforme

Il Glioblastoma Multiforme (GBM) è una forma anaplastica ed estremamente aggressiva di astrocitoma del IV grado della stadiazione WHO e rappresenta la neoplasia cerebrale più comune nell'adulto, con un tasso di incidenza di 5,26 casi su 100.000 e 17.000 nuovi casi annuali. Nonostante il termine blastoma richiami i tessuti embrionali, il GBM può insorgere a tutte le età, ma nel 70% dei casi, la malattia è diagnosticata in pazienti con un età compresa fra i tra 45 e 70 anni [13].

Nella maggior parte dei pazienti, il GBM è localizzato negli emisferi cerebrali, ma non mancano casi in cui sono coinvolte anche altre regioni del CNS. Il decorso della patologia è variabile e dipende imprescindibilmente dalla sua origine istopatologica; infatti il GBM può svilupparsi con decorso lento da astrocitomi diffusi e anaplastici di II e III grado WHO (in questo caso prende il nome di GBM secondario), oppure, più frequentemente, si può manifestare *de novo* (GBM primario) in assenza di precedenti neoplasie, con un decorso rapido e progressivo che porta ad imminente decesso dei pazienti.

I trattamenti convenzionali utilizzati nella terapia del GBM comprendono una prima fase di asportazione chirurgica e radioterapia localizzata, la cui riuscita è determinata dal grado di infiltrazione delle cellule tumorali nei tessuti limitrofi, ed una seconda fase, necessaria nella maggior parte dei casi, mediante somministrazione farmaci chemioterapici.

La propagazione del GBM è accompagnata spesso da ampie emorragie, formazione di cisti e zone necrotico/apoptotiche che, alterando ulteriormente l'assetto fisiopatologico dell'encefalo, peggiorano la situazione clinica dei pazienti. Inoltre, nonostante non ci sia formazione di metastasi extracraniche, i fenomeni di angiogenesi sono ricorrenti. Per questi motivi l'inibizione degli edemi e dei fattori angiogenetici possono rallentare il

decorso della patologia. A questo proposito, insieme od in alternativa alla chemioterapia, viene somministrato il bevacizumab, costituito da un anticorpo monoclonale capace di riconoscere ed inibire il fattore di crescita endoteliale (VEGF) e di aumentare, seppur di pochi mesi, il tempo di sopravvivenza dei pazienti.

La sintomatologia dei pazienti non permette di prevedere e diagnosticare il GBM, in quanto i segni neurologici della patologia emergono solo in fase avanzata e risultano secondari alla pressione esercitata dalla massa all'interno della scatola cranica, mentre altri sintomi, quali cefalee e rigetti gastro-intestinali, risultano poco informativi.

Il tempo medio di sopravvivenza dei pazienti in seguito ai trattamenti convenzionali è di 12-14 mesi, ma non sono nulli i casi di sopravvivenza superiori ai 3 anni [14], solo in seguito ad estesa operazione chirurgica ed estensiva chemioterapia [15], anche se il tempo di sopravvivenza di questi casi sembra essere sovrastimato [16].

In alcune sindromi genetiche (Turcot, Li-Fraumeni) il GBM si presenta con un'elevata frequenza, ma le forme familiari rimangono comunque rare. Nonostante siano riportati in letteratura notevoli studi sulla biologia e la clinica dei tumori cerebrali, le cause del GBM rimangono ancora sconosciute. Tra le mutazioni genetiche ricorrenti, vi sono amplificazione genica del recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR) che insiste sulle vie di segnalazione della proliferazione cellulare, del gene MDM2 che, inibendo l'oncosoppressore TP53, promuove sopravvivenza della cellula e progressione del ciclo cellulare e del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR). Nel GBM primario possono esserci inoltre mutazioni a carico di geni oncosoppressori, fra cui p15, TP53, PTEN, RB1 e delezioni dei cromosomi 10p, 10q e 19q.

La maggior parte dei farmaci chemioterapici progettati sino ad oggi risulta inefficace nel trattamento del GBM. I trattamenti con Temozolomide (TMZ), un farmaco che alchila il DNA e induce apoptosi, sono stati correlati ad un aumento significativo del tempo di sopravvivenza (14,6 vs 12,1 mesi) in un trial clinico su circa 600 pazienti [17]. Il ruolo della TMZ è quello inibire la

replicazione delle cellule e promuovere il programma apoptotico mediante trasferimento di gruppi alchilici ai residui di adenosina e guanina dei nucleotidi, in modo tale da provocare rotture irreversibili nell'elica del DNA. A questo proposito, la funzionalità del gene riparatore del DNA O⁶-metil-guanina DNA metil-transferasi (MGMT) è stata correlata alla risposta dei pazienti a TMZ ed il grado di metilazione del suo promotore si sta rivelando un utile fattore prognostico nel determinare il tempo di sopravvivenza dei pazienti. Infatti l'azione degli enzimi riparatori del DNA è quella di stabilizzare il genoma andando a rimuovere i gruppi alchilici che vengono addizionati dai fattori alchilanti destabilizzanti, come ad esempio il TMZ. Nonostante questo, il TMZ rimane nella maggior parte dei casi il farmaco chemioterapico di elezione, in quanto la sua somministrazione aumenta l'efficacia dei trattamenti convenzionali sensibilizzando maggiormente le cellule alla radioterapia [18].

Neuroblastoma (NBL)

Insieme ai PNET, il NBL è la prima causa di morte per malattia in età prescolare. I tumori del sistema nervoso simpatico (SNS) costituiscono il 7% dei casi di tumore in età pediatrica con tasso di incidenza (TI) annuale standardizzato per età sulla popolazione italiana di 11,4 casi per milione di bambini (TI standardizzato sulla popolazione europea di 14,3 casi; TI standardizzato sulla popolazione degli USA di 10,2 casi), con massima frequenza nel primo anno di vita, periodo in cui rappresentano il tipo di neoplasia con l'incidenza più elevata e costituiscono il 29,7% dei casi di tumore .

Il grado di sopravvivenza presenta una differenza statisticamente significativa tra le diverse classi di età e, in particolare, risulta maggiore in casi diagnosticati entro il primo anno di età.

Il NBL rappresenta il 96% dei tumori del SNS ed è tipico dei tessuti nervosi periferici (neuro) che hanno subito difetti genici ed epigenetici durante lo

sviluppo del feto, con coinvolgimento di cellule staminali e precursori con fenotipi cellulari immaturi (blastoma). Il NBL, classificabile come tumore di tipo neuro-endocrino, rappresenta il tumore solido extracranico maggiormente diagnosticato durante il primo anno di vita. Nella maggior parte dei casi mostra una localizzazione addominale (ghiandole surrenali), ma il NBL può originare anche in altre regioni del corpo in cui sono coinvolte specificazioni della cresta neurale e catene simpatiche. Infatti, più precisamente, la regione ad essere colpita è il sistema nervoso autonomo, cioè quell'insieme di fibre nervose, gangli e ghiandole neuro-endocrine che controlla funzioni involontarie come ad esempio battito cardiaco, respirazione e digestione.

In circa il 50% dei pazienti affetti, il NBL si presenta con una forma di malattia localizzata; tuttavia le metastasi in distretti secondari sono frequenti per il coinvolgimento del sistema vascolare. L'evoluzione clinica è variabile, infatti nonostante il 40% dei casi presenti rapide forme progressive e letali, persino sotto regime terapeutico aggressivo, significativi sono i casi in cui si assiste ad una spontanea regressione senza terapia. Un'accurata valutazione dell'estensione della malattia è essenziale per la valutazione prognostica e la scelta terapeutica [19].

Il NBL è un tumore complesso in cui l'eterogeneità rappresenta la principale caratteristica clinica [19] e, da un punto di vista istopatologico, viene classificato in base alla dimensione ed alla diffusione dal sito originale secondo la seguente stadiazione: stadio 1, NBL localizzato e rimovibile mediante chirurgia; stadio 2A, NBL localizzato ma non completamente rimovibile mediante chirurgia; stadio 2B, NBL localizzato nel sito di origine ma presente nei linfonodi limitrofi; stadio 3, NBL diffuso in tessuti e organi limitrofi, ma non in regioni distanti; stadio 4, tumore diffuso in regioni distanti dal sito originale, comprese ossa, pelle, fegato ed altri organi; stadio 4s, NBL in pazienti che hanno meno di un anno di vita, tipicamente localizzato come accade negli stadi 1, 2A e 2B, ma già proiettato verso tessuti e organi, anche distanti dalla localizzazione principale. Un altro tipo di classificazione, maggiormente utilizzata in clinica, è basata sul grado di rischio INRG

(International Neuroblastoma Risk Group [20]) in relazione alla presenza di alcuni fattori ricorrenti, e comprende: *stadio L1*, NBL Localizzato di tipo 1 rimovibile attraverso chirurgia; *stadio L2*, NBL Localizzato di tipo 2, presenta chiari fattori di rischio ed è rimovibile solo parzialmente mediante chirurgia; *stadio M*, NBL Metastatico, diffuso in altre regioni del corpo; *stadio MS*, NBL Metastatico, diffuso solamente in pelle, fegato e midollo osseo in neonati fino al diciottesimo mese di vita.

Tra i marker biochimici di NBL, si annoverano correlazioni tra estensione tumorale e livelli di catecolamine (acido vanilmandelico ed acido omovanillico) presenti nelle urine del 90% dei pazienti al momento della diagnosi [34], mentre i livelli di lattico deidrogenasi (LDH), enolasi neurone specifica (NSE), ferritina e cromogranina vengono indicati come fattori che influenzano prognosi e follow-up della patologia [33,36]. Analisi molecolari su biopsie hanno permesso di stabilire casi di iperplodia nei tumori a basso rischio e riarrangiamenti cromosomici con perdita di eterozigosi, accompagnati da acquisto o perdita di funzione genica, nei NBL ad alto rischio. Esempi di marker molecolari sono amplificazione del proto-oncogene MYCN (meno del 20% dei casi), delezione del braccio corto del cromosoma 1 (30% dei casi) ed espressione del proto-oncogene TRK, recettore tirosin-chinasi che viene attivato da fattori di crescita neuronali [21].

Numerosi Fattori (età alla diagnosi, stadiazione della patologia, marker genetici e molecolari) hanno un impatto negativo nella prognosi e nel grado di responsività ai trattamenti convenzionali. Inoltre, a differenza di altri tumori, il NBL è caratterizzato dall'assenza di ricorrenza di disfunzioni e/o modificazioni geniche, che si presentano solamente nei casi familiari (<2%) e molto raramente nei casi sporadici. Queste caratteristiche, insieme ad una elevata eterogeneità cellulare accompagnata da mancanza di epitopi specifici e presenza di cellule tumorali con proprietà staminali, rendono estremamente complicato lo sviluppo di terapie specifiche ed efficaci nel trattamento del NBL ad alto rischio [22]. Nella maggior parte dei casi, le cellule tumorali di NBL mostrano un'elevata eterogeneità cellulare e molecolare con fenotipi cellulari che possono mutare e differenziare lungo il

decorso della patologia, segno evidente della natura staminale di questo tumore.

Nonostante siano stati raggiunti notevoli risultati nella terapia dei tumori pediatrici, significativi sono i casi in cui il trattamento convenzionale, anche associato a tecnologie farmaceutiche di nuova generazione ed a terapie immunomodulanti, non ottengono l'effetto desiderato [22]. Nella chemioterapia standard per il NBL sono previste diverse combinazioni di vari farmaci, in relazione al rischio ed alla natura del tumore. Temozolomide, ciclofosfamide, melphalan (agenti alchilanti il DNA), irinotecan, topotecan, etoposide (inibitori delle topoisomerasi), ed altri farmaci come doxorubicina, cisplatino, vincristina e isotretinoina (quest'ultimo analogo dell'acido retinoico che stimola il differenziamento e di conseguenza la perdita dei tratti di staminalità) vengono regolarmente somministrati, in associazione a radioterapia, in pazienti affetti da NBL localizzato ad alto rischio; diversamente, in caso di metastasi, l'immunoterapia con anticorpi anti-gangliosidici, GD2 e GD3, sembra essere la terapia adiuvante maggiormente efficace. Indubbiamente, il NBL stadio 4 è ancora il problema maggiore per gli oncologi pediatri, infatti in questo gruppo di pazienti il tumore presenta fenomeni di evasione dal sistema immunitario attraverso l'acquisto di un fenotipo staminale tumorale ed il tempo medio di sopravvivenza è rimasta invariato negli ultimi 20 anni.

Teoria delle Cancer Stem Cells (CSC) e proprietà dei tumori maligni

Modello gerarchico di iniziazione e propagazione dei tumori

Il modello tradizionale del cancro descrive il tumore come un *prodotto clonale* di una cellula mutata, capace di generare esponenzialmente una massa tumorale composta da cellule identiche alla cellula dalla quale hanno origine. Di conseguenza, tutte le cellule di una massa essendo uguali fra loro, sarebbero in grado di originare altri tumori; detto in altri termini, tutte le cellule sarebbero ugualmente oncogeniche, cioè avrebbero la stessa capacità di formare tumori in trapianti seriali in vivo. La crescita incontrollata delle cellule, dovuta a mutazioni genetiche che favoriscono la proliferazione cellulare ed inibiscono le vie apoptotiche, porta ad una trasformazione maligna irreversibile. Classicamente, la formazione di una cellula tumorale a partire da una cellula normale presuppone l'accumulo di una serie di mutazioni a carico di geni coinvolti nelle vie di segnalazione della crescita autonoma ed illimitata, della resistenza ai segnali di arresto ed evasione dall'apoptosi, oltreché induzione di angiogenesi, invasione e metastasi. Per cui, nel modello tradizionale, la patologia è riconducibile alla perdita del controllo della proliferazione cellulare; tuttavia da un punto di vista strettamente matematico, la probabilità che una singola cellula possa subire tutte le mutazioni necessarie per garantire la propagazione di un fenotipo tumorale è estremamente bassa. Più recentemente si è scoperto che, come accade nei tessuti adulti, anche la maggior parte dei tumori contiene una esigua sottopopolazione di cellule capaci di auto-rinnovamento estensivo e proliferazione per periodi lunghi, con un potenziale di differenziazione multi-linea verso cellule morfologicamente e funzionalmente differenti. L'isolamento e la caratterizzazione molecolare delle sottopopolazioni tumorali con tali proprietà ha permesso di constatare che solo alcune cellule (e non qualsiasi cellula della massa tumorale) sono capaci di crescere

indefinitamente *in vitro* e di rigenerare tutti i fenotipi che erano presenti nel tumore di origine. Sperimentalmente, queste cellule vengono definite dalla loro abilità di far ricrescere il tumore *in vivo* e notoriamente hanno un potenziale oncogenico maggiore rispetto alle cellule tumorali differenziate.

La teoria dell'espansione gerarchica suggerisce che i tumori nascono e si sviluppano a partire dalle CSC, descritte in letteratura anche come "cellule iniziatrici il tumore", dall'inglese *tumor-initiating cells* (TIC). Le TIC mostrano proprietà delle cellule staminali, in particolare *self-renewal* e multipotenzialità e, nonostante rappresentino solo una piccola frazione di tutta la massa tumorale, essendo le *niche* cellule in grado di formare tumori in trapianti seriali rappresentano la forza motrice che spinge il tumore verso un grado elevato di malignità. Studi clinici suggeriscono che i tumori in cui vengono coinvolte cellule staminali tumorali sono associati ad alti tassi di metastasi e prognosi infauste nei pazienti [23].

Da questa prospettiva, il tumore è un prodotto di espansioni clonali di varie sottopopolazioni, dovute all'alterazione genetica ed epigenetica dei meccanismi di auto-rinnovamento e differenziazione delle cellule staminali (*Fig. 1*).

Per cui, un singolo tumore potrebbe contenere diverse sotto-popolazioni di cellule staminali geneticamente distinte, ma che saranno in ogni caso originate da un progenitore comune, corrispondente alla cellula staminale tumorale di partenza che ha subito le mutazioni sfavorevoli. Parimenti, cellule tumorali con lesioni genetiche simili potrebbero occupare gradi differenti di un sistema gerarchico fisiologico (tissutale) e, tramite divisione asimmetrica caratteristica delle cellule staminali, generare ulteriore eterogeneità cellulare e molecolare. Inoltre, ogni cellula staminale figlia avrebbe maggiori possibilità di subire ed accumulare successive mutazioni che permetterebbero di sostenere la crescita del tumore.

Se le mutazioni compaiono in cellule già differenziate, difficilmente si assisterà alla comparsa di una massa ad elevato grado di malignità; viceversa, se ad essere mutate sono le cellule staminali o i progenitori, si potrebbe assistere, in seguito a proliferazione e differenziamento, alla comparsa di

sotto-popolazioni staminali differenti che possono accumulare una combinazione seriale di mutazioni sfavorevoli tali da formare un tumore estremamente eterogeneo, come accade ad esempio nel Glioblastoma Multiforme.

Un gruppo di ricerca nel campo della *systems biology* ha dimostrato recentemente con un modello matematico, riprodotto e confermato sperimentalmente, una chiara connessione fra l'eterogenità tumorale e la staminalità [24]. In questo report, i ricercatori hanno stabilito che il modello tumorale gerarchico improntato sulla teoria staminale del cancro è da preferire ad un modello stocastico non gerarchico, in quanto solo il primo modello predice fedelmente il tumore primario *in vivo*, in termini di malignità, aggressività, eterogenità e conseguente resistenza ai trattamenti farmacologici.

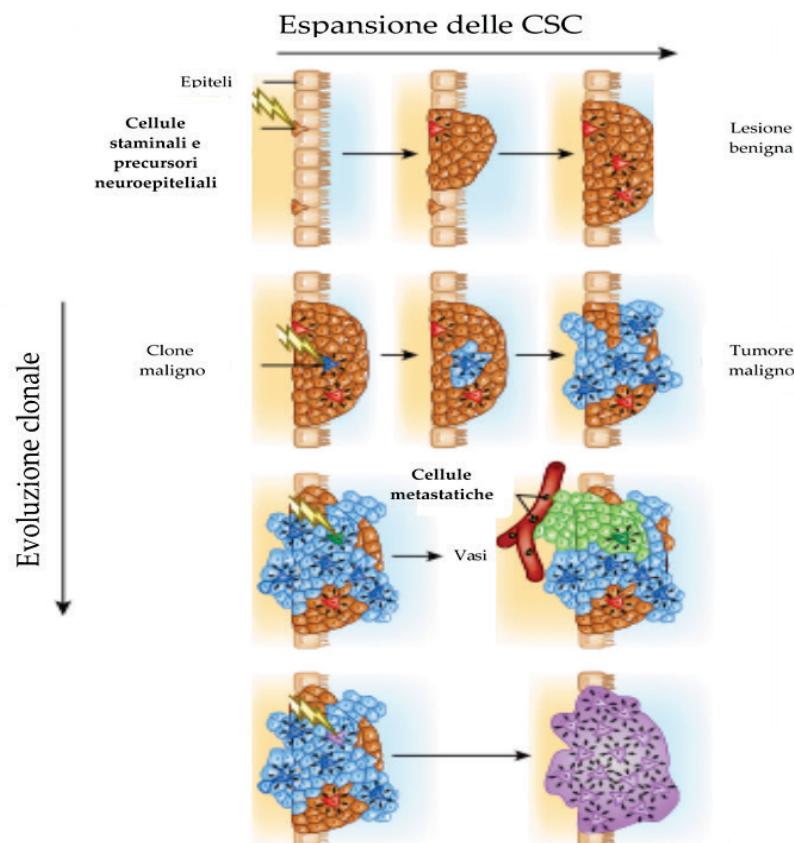


Figura 1 – Il tumore è un fenomeno eterogeneo: una visione mutuata fra evoluzione clonale ed espansione staminale. Riadattato da [25]

La differenza sostanziale sta nella considerazione secondo la quale il tumore non viene più considerato come un prodotto proliferativo di una qualsiasi cellula che accumula sufficienti mutazioni genetiche, bensì, più precisamente, come una malattia delle cellule staminali, le uniche cellule che sarebbero in grado di sostenere e propagare indefinitamente l'andamento della massa tumorale e l'insorgenza delle metastasi. La visione staminale del cancro, in associazione - e non in sostituzione - al modello di evoluzione clonale, darebbe ragione d'esistere alla vasta eterogeneità cellulare e molecolare riscontrata nei tumori, soprattutto in quelli maligni e maggiormente aggressivi.

Sebbene siano state collezionate una serie di nozioni e prove collimanti con la teoria delle CSC, rimangono ancora insolute problematiche relative ad una reale applicazione di tale teoria in campo traslazionale, fra cui assenza di specificità dei marcatori staminali in vari tumori e difficoltà nell'interpretazione di dati derivanti da xenotrapianti [26]. Inoltre è doveroso sottolineare che la teoria delle CSC, nonostante ne modifichi intrinsecamente il paradigma, non si pone come estrema alternativa al modello tradizionale del cancro (*Fig. 1*).

Recentemente è stato dimostrato che cellule tumorali di GBM e di NBL negative ai marker di staminalità - CD133 e CD44 rispettivamente - sono state in grado di formare tumori *in vivo* [27, 28] e che l'espressione di CD133 ha una valenza prognostica ambigua in pazienti con ricadute, trattati con TMZ e radioterapia [29]. Questi dati sono stati interpretati in più modi. Da una parte, è emersa l'assenza di marker *definitivi* di staminalità, in quanto persistono seri dubbi sulla reale utilità dei marker - rivelati tramite immunofenotipizzazione - nell'identificazione ed attribuzione della staminalità ad un dato tipo cellulare e, conseguentemente, del loro utilizzo nella ricerca traslazionale in campo clinico. D'altra parte, è stata proposta una conversione bidimensionale fra compartimenti staminali e non staminali, suggerendo che una cellula tumorale differenziata, in relazione al micro-ambiente in cui si trova, può andare incontro a de-differenziazione ed assumere un grado differente nella scala gerarchica del tessuto e "revertare" di fatto il proprio

fenotipo verso quello di una cellula staminale o un precursore, acquisendo di fatto maggiore potenziale oncogenico e capacità di metastasi; un esempio di quest'ultima assunzione deriva dal fenomeno della *plasticità* cellulare, innata o acquisita, come accade nella transizione epiteliale-mesenchimale (EMT). Non si esclude inoltre che cellule staminali tumorali possano derivare anche da rari eventi di fusione fra cellule staminali ed altri tipi cellulari [30].

Transizione epiteliale-mesenchimale e cancro

La transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) è stata inizialmente riconosciuta come caratteristica peculiare dell'embriogenesi. Questa transizione fenotipica risulta indispensabile nel corretto sviluppo di tessuti e organi ed in numerosi eventi, come ad esempio gastrulazione, formazione della cresta neurale e delle valvole cardiache [31, 32]. Le differenze nel fenotipo e nella funzione tra cellule epiteliali e cellule mesenchimali sono notevoli. Le cellule epiteliali esprimono E-caderina, presentano una morfologia apico-basale, polarizzazione del citoscheletro di actina e connessioni con cellule adiacenti per mezzo di giunzioni aderenti, giunzioni strette e *gap junctions*. Le cellule mesenchimali, diversamente dalle epiteliali, non presentano polarità cellulare, entrano in contatto tramite punti focali e producono N-caderina, vimentina e fibronectina [33].

La formazione di metastasi *in vivo* può avvenire esclusivamente se le cellule tumorali acquisiscono nuove capacità migratorie ed invasive. Una serie di studi sperimentali e di indagini cliniche hanno permesso di stabilire che il fenomeno dei tumori metastatici risulta sostenuto dalla transizione EMT e dal suo processo reversibile MET (transizione mesenchimale-epiteliale), attraverso l'azione concertata di citochine, molecole della matrice extracellulare ed altri fattori di crescita. La transizione EMT promuove la disseminazione delle cellule del tumore primario (distacco delle cellule epiteliali dalla lamina basale), mentre la transizione MET favorisce

l'ancoraggio e la proliferazione delle cellule tumorali in altri organi target, con conseguente formazione di metastasi [34, 35].

Nei tumori, le cellule che vanno incontro a EMT perdono i contatti cellula-cellula mediati dalla E-caderina, si distaccano dalla lamina basale e acquisiscono un potenziale invasivo elevato, con conseguente migrazione nei tessuti circostanti e nel torrente circolatorio. Successivamente, quando queste cellule tumorali circolanti (CTC) si instaurano in nuovi organi per formare micro-metastasi, l'attivazione del programma MET permette un'espansione clonale dei tipi cellulari epiteliali e formazione di masse metastatiche di grandi dimensioni [36]. Inoltre fenomeni di senescenza, apoptosi ed efficacia dei farmaci nei tumori risultano sensibilmente inibiti dalla transizione EMT, mediante attivazione da parte di TGF- β ed altri fattori extracellulari di geni che promuovono invasione ed evasione dalla sorveglianza immunitaria [37, 38].

Le cellule tumorali che vanno incontro ad EMT riescono ad invadere i tessuti ed acquisiscono proprietà simili alle cellule staminali, come mostrano gli aumenti dell'espressione di marker di staminalità in seguito alla transizione [39]. In questo quadro, la situazione si complica ulteriormente in quanto i nuovi fenotipi cellulari, oltre ad essere maggiormente migratori ed invasivi, risultano avere anche un potenziale oncogenico di gran lunga maggiore per via dei tratti staminali acquisiti, e conseguente resistenza ai farmaci [40].

Come riportato in precedenza, il programma EMT è un notevole esempio di plasticità cellulare a carattere staminale, fondamentale per la progressione del cancro, nonostante sia stato pubblicato proprio recentemente un lavoro in cui si dimostra attivazione delle vie che portano alla transizione EMT simultaneamente ad una inibizione delle vie di segnalazione staminali [35].

Nei tessuti adulti sani, la transizione EMT è un evento raro e sembra essere inibito proprio da funzioni restrittive operate dal micro-ambiente che, con le sue interazioni multiple, stabilizza i fenotipi delle cellule adulte/differenziate verso il ruolo fisiologico ottimale, prevenendo comportamenti "plastici". Infatti, la disposizione e la composizione delle fibre della matrice extracellulare [41] e la disponibilità di citochine e fattori di crescita sono noti

per modulare le funzionalità cellulari e promuovere le transizioni tra epitelio e mesenchima. Inoltre, numerosi fattori di trascrizione e altre molecole regolatrici, intra ed extra-cellulari, sono in grado di mediare queste transizioni, dimostrando ancora una volta l'importanza e la composizione del micro-ambiente nel fenomeno cancro [42].

Eterogeneità cellulare, micro-ambiente tumorale e staminalità

I tratti caratteristici delle neoplasie, quali intensa attività proliferativa, evasione apoptotica, resistenza a morte cellulare, induzione di angiogenesi, attivazione di programmi di replicazione per tempi indefiniti, e formazione di metastasi, descritti in maniera dettagliata da Hanahan e Weinberg in un articolo del 2000 [43] sono stati rivisitati dagli stessi autori [44] e da altri [45] alla luce di un confronto maggiormente discriminante tra il cancro nella sua forma maligna e le altre forme benigne di tumore. In questo contesto, la composizione del micro-ambiente tumorale, la capacità di riprogrammare il metabolismo cellulare, l'evasione dal sistema immunitario e la composizione eterogenea del cancro sono stati considerati, da un punto di vista caratterizzante, alla stregua dei concetti base elencati in precedenza.

L'eterogeneità cellulare e molecolare è un tratto caratteristico della maggior parte dei tumori e, come spiegato in precedenza, non può essere il prodotto di un'espansione clonale di un'unica cellula. A conferma dell'origine staminale dell'eterogeneità, sono state isolate e caratterizzate esigue sotto-popolazioni, anche differenti fra loro, di cellule staminali tumorali all'interno della stessa massa tumorale e che queste erano in grado di rigenerare i fenotipi presenti nel tumore iniziale [46].

Le singole sotto-popolazioni tumorali, aventi potenziali oncogenici differenti e meccanismi molecolari che le contraddistinguono dalle altre, interagiscono diversamente con il micro-ambiente tumorale ed incidono sull'eterogeneità, come si pensa accada nei tumori ad elevato grado di malignità, come gliomi e

nei tumori PNET. Emblematici sono i casi di GBM e di NBL grado M ed MS, in cui si può notare sia una chiara origine staminale, che un elevato grado di eterogeneità, oltre ad uno *switch* nel grado di differenziamento delle cellule coinvolte. Nel cancro al seno ed in altri tumori, la frequenza delle cellule tumorali positive ai marker di staminalità e di differenziamento varia in accordo al sottotipo tumorale ed al grado istologico [47]. Anche alcune linee umane stabilizzate di glioblastoma e neuroblastoma presentano subpopolazioni cellulari con caratteristiche morfologiche e molecolari differenti. Per quanto riguarda le linee cellulari di Neuroblastoma, sembra valere la teoria dei tipi cellulari denominati N, S ed I [48]. Il tipo-N presenta scarso citoplasma, processi neuritici, neurofilamenti, pseudoganglia e apparato per la produzione di neurotrasmettitori; viceversa il tipo-S è aderente al substrato, con citoplasma esteso ed espressione di CD44 e vimentina. Invece il tipo-I (intermediate type) ha differenti caratteristiche morfologiche, biochimiche, tumorigeniche e di differenziamento rispetto agli altri e presenta anche caratteristiche del tipo-N e del tipo-S, potendosi differenziare nei loro tipi in seguito a segnalazione da parte di agenti esterni. Il tipo-I è significativamente più maligno rispetto ai tipi N ed S e rappresenterebbe in un'ottica staminale, la fonte della tumorigenicità.

Studiando in maniera approfondita la biologia delle ASC, è diventato evidente un ruolo delle CSC nell'insorgenza e propagazione dei tumori e nella resistenza alle terapie. Forti evidenze suggeriscono che questo comportamento non è ascrivibile solo alla natura ed unicità delle CSC, ma anche e soprattutto al background (epi)genetico ed al micro-ambiente in cui si trovano; infatti come le ASC, le CSC mostrano un comportamento variabile in relazione alla composizione dell'ambiente extracellulare ed ai profili metabolici ed epigenetici intrinseci, specialmente in quei tumori in cui mancano mutazioni somatiche ricorrenti, come nel caso di Neuroblastoma [21]. Inoltre sono presenti in letteratura numerosi studi di associazione fra composizione della ECM, presenza di CSC e risposta alle terapie che mettono in evidenza il significato biologico e clinico del micro-ambiente tumorale.

Normalmente, l'organizzazione funzionale di un tessuto dipende da una serie di fattori che vedono coinvolte le cellule parenchimali in un interscambio continuo con cellule stromali, epiteliali ed ambiente extracellulare. Le cellule comunicano con tra loro attraverso giunzioni cellula-cellula ed interazioni cellula-ECM, mediante interazioni statiche e dinamiche regolate da ormoni e fattori solubili [41]. La ECM è composta da glicoproteine, proteoglicani, collagene ed elastina. Queste molecole hanno il compito di preservare e stabilizzare i tessuti, promuovere l'adesione e modulare la funzionalità delle cellule attraverso l'attivazione di specifiche vie di segnalazione intracellulari mediata da interazioni con recettori cellulari di superficie [49]. È stato dimostrato che la ECM ha un ruolo strutturale, biochimico e meccanico nella normale crescita e nel differenziamento delle cellule staminali [50] e nella propagazione del cancro [51]. La complessa architettura della nicchia delle ASC è composta da una rete di vasi e cellule (stromali, mesenchimali e del sistema immunitario) rivestite di ECM [52]. Come le ASC, le CSC sono influenzate da interazioni con altre cellule ed il micro-ambiente. Infatti, dati recenti suggeriscono che le CSC dipendono da una sorta di nicchia, simile a quelle delle ASC, che ne controlla auto-rinnovamento e differenziamento [53, 54] attraverso modulazione di vie di segnalazione specifiche, come ad esempio le vie di Notch, Wnt, EGF ed Hedgehog, da parte di segnali estrinseci provenienti dal micro-ambiente [55-57]. Inoltre è stato dimostrato che le nicchie proteggono le CSC da insulti genotossici esterni e promuovono alti tassi di enzimi di riparazione del DNA. Questo scenario implica una minor efficacia delle terapie convenzionali nel trattamento dei tumori in quanto la nicchia, alimentando il *self-renewal* e proteggendo le CSC dai farmaci, preserva le CSC dagli insulti genotossici esterni [58]. Nel GBM, le interazioni fra CSC, stroma ed ambiente extracellulare portano ad una attivazione sinergistica di una serie di pathways specifici [58, 59] che permettono alle CSC, residenti nel core del tumore, di auto-rinnovarsi e sopravvivere sotto stress in ambiente ipossico e povero di fattori di crescita [60]. Collettivamente, vengono in questo modo innescati crescita del tumore,

resistenza alle terapie, fenomeni di migrazione ed angiogenesi e conseguente invasione di vaste regioni cerebrali in tempi brevi.

Queste nuove conoscenze hanno permesso di stabilire un ruolo delle CSC e della ECM nella progressione, metastasi e ricorrenza del GBM, spronando allo stesso tempo la ricerca di terapie mirate contro le CSC ed il loro micro-ambiente, in modo tale da non modificare il mantenimento delle ASC endogene non tumorali. A questo proposito, una recente analisi multi-parametrica computazionale su 184 bambini affetti da Neuroblastoma ha permesso di stabilire che gli elementi della ECM emergono come fattori prognostici chiave nella stratificazione del rischio e possono essere utilizzati come target molecolari per terapie specifiche [61]. Per tutti questi motivi, il micro-ambiente delle CSC, inclusi siti di legame con ECM e vie di segnalazione associate, viene considerato oggi come potenziale target nella terapia dei tumori maggiormente aggressivi.

CSC e cellule progenitrici stem-like nei tumori aggressivi

Proprietà e vie di segnalazione delle CSC

Lo sviluppo ed il differenziamento neurale sono governati da specifiche vie di segnalazione promosse da una serie di fattori in forma autocrina o paracrina. Questi fattori, prodotti e secreti verso l'esterno dalle cellule del microambiente tumorale, interagiscono con i corrispondenti recettori che, una volta attivati, trasmettono l'informazione all'interno della cellula. Il risultato è un cambiamento nella funzione cellulare strettamente governato dalle attivazioni di vie di segnalazione specifiche e trans-attivazioni incrociate delle stesse ad opera di altri fattori.

Durante lo sviluppo, le vie di segnalazione principali in ESC sono quelle relative a Notch, Wnt e Sonic Hedgehog [62]. Nei tumori del SN è stata dimostrata una espressione aberrante di alcune di esse (Wnt, Notch) ed altri fattori dello sviluppo e del differenziamento neurale, ad esempio TGF- β /BMP. Inoltre la via di EGF sembra insistere in maniera incrociata sulla via di Notch. Il *pathway* di Notch ha un ruolo di primaria importanza nell'organizzazione molecolare delle cellule staminali tumorali di glioblastoma [63] e viene regolato da diversi geni costitutivamente espressi, fra cui le vie di segnalazione di STAT3 ed NF- κ B [64]. La via di segnalazione canonica di Wnt è un circuito regolatore tipico delle cellule staminali. Come per altre vie di segnalazione legate alla staminalità, Wnt è stata associata *in vivo* ed *in vitro* all'insorgenza ed alla propagazione di tumori maligni in una varietà di tessuti, fra cui seno [65], colon [66], cervello [67], pancreas [68]. Per questo motivo, è stato insistentemente proposto che la via di Wnt, che predilige generalmente autorinnovamento cellulare nelle cellule staminali e progenitrici, può essere sovvertita nelle cellule (staminali) tumorali per consentire progressione maligna [57] e, dimostrato recentemente, iper-differenziamento cellulare [69].

La resistenza ai farmaci chemioterapici è una caratteristica propria dei tumori maligni ed è in stretta relazione al grado di organizzazione strutturale e molecolare delle cellule. Numerose indagini riportano inoltre una chiara associazione tra farmacoresistenza cellulare, grado di staminalità delle cellule coinvolte ed eterogeneità dei tumori.

La valutazione della risposta ai trattamenti farmacologici in modelli cellulari *in vitro* rappresenta il primo step nella progettazione e nella sperimentazione dei farmaci antineoplastici. Il farmaco TMZ è stato associato a resistenza in una serie di indagini cliniche e prove sperimentali *in vitro*. L'effetto della TMZ su modelli staminali è controverso, in quanto alcuni studi riportano fenomeni di resistenza mentre altri affermano addirittura una specificità di azione del farmaco nei confronti delle CSC [70], suscitando criticità circa gli standard adottati nei xenotrapianti seriali [71].

Le recenti applicazioni in campo terapeutico mirano ad operare una regolazione estrinseca dei *pathway* di staminalità, responsabili del mantenimento e della propagazione del tumore, con lo scopo di aumentare l'efficacia dei trattamenti terapeutici ed il TI dei pazienti.

CSC di numerosi tessuti sono state categorizzate in relazione alla positività ad antigeni CD (*cluster of differentiation*) espressi nella superficie delle cellule. Numerose patologie tumorali presentano arricchimento in recettori CD e, grazie all'espressione di questi, sono state isolate e purificate numerose linee staminali tumorali primarie. Nonostante questo approccio si stia rilevando di estrema utilità nella caratterizzazione molecolare delle cellule di vari tumori, in neoplasie del SN i marker CD non risultano realmente indicativi di staminalità e portano ad una serie di complicazioni nell'effettivo isolamento e propagazione delle CSC.

Da un punto di vista clinico, la mancanza di marker molecolari di staminalità stabili e specifici per le diverse neoplasie del sistema nervoso e la variabilità intrinseca negli esperimenti che prevedono xenotrapianti, risultano ad oggi i fattori maggiormente limitanti nello studio immuno-fenotipico e funzionale delle CSC [26, 27]. A questo proposito, la disponibilità di modelli *in vitro* nelle colture di linee staminali tumorali nervose rappresenta un modello ideale per

l'identificazione di pattern molecolari e specifici antigeni utili nella caratterizzazione delle cellule. Lo sviluppo di agenti che selettivamente bersagliano ed inibiscono la crescita e la propagazione di queste cellule potrebbe ridurre o eliminare l'insorgenza, la crescita e la ricorrenza dei tumori primari. Con l'avanzamento delle conoscenze riguardo la natura delle proprietà staminali del cancro, il razionale del trattamento farmacologico è destinato ad avere numerose ripercussioni, in quanto la staminalità sembra correlare con il grado di malignità e di farmacoresistenza. Risultati promettenti derivano dalla progettazione di farmaci in grado di agire selettivamente sulle CSC, eradicando la sorgente del tumore per ottenere la degenerazione completa della massa tumorale [72, 73].

Sfere tumorali 3-D come modello di espansione staminale

I primi tentativi nell'allestimento di colture staminali non hanno portato molti risultati, in quanto le condizioni di crescita in terreni classici, addizionati di siero, favorivano il mantenimento di un fenotipo differenziato. Nel 1992, Reynolds e colleghi pubblicano per la prima volta un metodo di coltura in sospensione che permette di mantenere ed arricchire cellule staminali neuronali responsive ai fattori EGF e bFGF, attraverso la generazione di una struttura 3D composta da cellule aggregate fra loro, chiamata neurosfera [74, 75].

Le neurosfere, avendo forma di sferoide tridimensionale, è composta da due compartimenti: uno interno anossico, in un cui risiedono le cellule staminali ed i progenitori, ed uno esterno, maggiormente esposto ad ossigeno e fattori di crescita, che si arricchisce in cellule differenziate. Numerosi studi basati su formazione di neurosfere da cellule staminali di varie regioni del SNC, mostrano che i pattern di espressione di geni che controllano lo sviluppo vengono mantenuti dalle colture anche dopo molti passaggi e che alcune cellule al loro interno vanno incontro a differenziamento tessuto-specifico

caratteristico della regione cerebrale originaria da cui venivano espianate [76-78].

Qualche anno più tardi, ricercatori di livello internazionale nella ricerca sulle ASC e CSC, come ad esempio l'italiano Angelo Vescovi, hanno pensato di adottare ed adattare questo metodo di coltura a cellule staminali isolate da tumori primari, ottenendo risultati alquanto sorprendenti [79-83]. In letteratura sono riportati numerosi studi in cui si dimostra che solo le ASC o le CSC, o varianti simili (CSC-like) come ad esempio cellule progenitrici, e non le cellule differenziate, hanno la capacità di generare neurosfere in un ambiente definito *in vitro*, mantenendo comportamenti spaziali, temporali e funzionali tipici del tessuto di origine *in vivo* [84, 85]. Inoltre, indagini molecolari mediante *microarray* e *next-generation sequencing* rivelano che, da un punto di vista molecolare, linee tumorali espanse mediante generazione di neurosfere rispecchiano maggiormente i tratti molecolari caratteristici del tumore da cui derivano; viceversa, le stesse cellule allestite mediante colture primarie standard, ossia dissociazione del pezzo tumorale o linee tumorali stabilizzate in terreni addizionati di siero fetale, mostrano differenziamento e morfologia/funzionalità divergenti dal tumore primario e dalle stesse neurosfere esibendo profili molecolari estremamente discordanti. Più nello specifico, neurosfere ottenute da biopsie di pazienti GBM, fatte crescere in terreno privo di siero specifico per la crescita delle staminali neuronali (NSM-SFM), sono arricchite in CSC che riproducono fedelmente l'eterogeneità del tumore primario in termini di fenotipo, tratti genomici e vie di segnalazione coinvolte, mentre a differenza delle colture primarie in condizioni di aderenza che perdurano il loro specifico fenotipo e non quello del tumore dei pazienti [86, 87].

Un parallelismo tra modello *in vitro* e modello *in vivo* emerge anche a livello strutturale e funzionale, in relazione ad un modello concentrico di GBM proposto recentemente (*Fig. 2*).

I fattori che vengono addizionati al terreno SFM per ottenere neurosfere da una popolazione cellulare eterogenea sono molteplici; in particolare, l'EGF viene addizionato per stimolare la proliferazione delle cellule staminali [88]

e dei progenitori neurali tardivi (Tropepe V., et al., 1999), il fattore bFGF per stimolare la proliferazione di cellule multipotenti, come progenitori neurali precoci in grado di differenziarsi in astrociti o neuroni [89, 90] ed il supplemento B27, specifico per il mantenimento e la crescita dei neuroni.

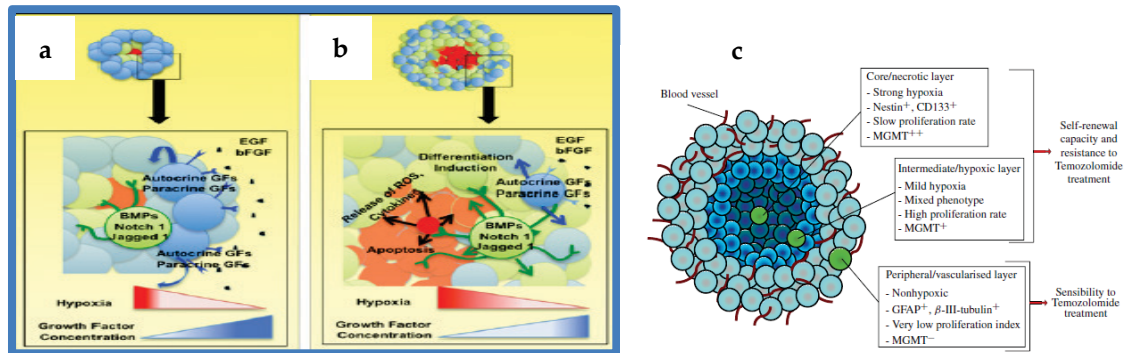


Figura 2 – Gradienti concentrici di pO₂, fattori di crescita e vie di segnalazione nei tumori al cervello; similitudini tra modello *in vitro* delle neurosfere 2.a e 2.b [91] e modello di GBM *in vivo* 2.c [92]. 2.a; induzione *in vitro* e regolazione paracrina delle CSC all'interno della sfera precoce, Ø 40-100 µm. 2.b; mantenimento staminale accompagnato da apoptosi e differenziamento cellulare nella sfera tardiva, Ø 100-300 µm. 2.c; modello concentrico di GBM *in vivo*, con CSC resistenti al farmaco TMZ, residenti all'interno della massa tumorale in un ambiente privo di O₂, e cellule differenziate, sensibili al farmaco, rivolte verso l'esterno a contatto con i vasi sanguigni.

In particolare nella SVZ, il pathways di Notch regola l'identità staminale e l'auto-rinnovamento, mentre EGFR influenza la proliferazione e la migrazione dei progenitori neurali. A questo proposito è stato dimostrato che EGF è responsabile del mantenimento di un equilibrio fra cellule staminali e progenitori neurali attraverso l'attivazione indiretta delle vie di Notch da parte di fattori a valle del pathway di EGFR. EGF in questa maniera è responsabile del mantenimento delle cellule staminali neurali contestualmente ad una promozione dell'attività proliferativa o migratoria in relazione al micro-ambiente della nicchia [93].

I terreni vengono addizionati anche di altri fattori, quali glutamina, PDGF, IGF-like, putrescina ed antibiotici, che insieme agli altri hanno lo scopo di mantenere le colture a lungo termine ed in uno stato indifferenziato [94, 95].

I terreni NSC SFM, con combinazioni specifiche dei fattori elencati in precedenza ed in determinate condizioni di crescita, sono in grado di arricchire popolazioni cellulari in CSC e/o CSC-like [96-98]. Il modello 3-D in

terreno SFM, paragonabile da un punto di vista funzionale al tumore *in vivo* più di qualsiasi altro metodo *in vitro*, è stato utilizzato nella coltura e arricchimento di CSC-like da tumori e linee cellulari di varia origine, fra cui glioblastoma multiforme [83, 87], neuroblastoma [99-103], melanomi [104] e tumori del colon-retto [54, 105-108] ed al seno [79, 109], polmone [110-112] e ovaio [113-116]. Nell'arricchimento di CSC e CSC-like mediante sfere 3-D si deve comunque tener conto di alcuni parametri che spesso si rivelano critici per un arricchimento uniforme ed ottimale, fra cui concentrazione e purezza dei fattori addizionati e metodo e frequenza dei passaggi [84, 117].

Criteria di identificazione

Cellule staminali tumorali sono state identificate e isolate da diversi tumori del SN, centrale e periferico, in particolare GBM e NBL. Le CSC di GBM mostrano tutte le caratteristiche delle cellule staminali neurali, fra cui un set di marker di identificazione e vie di segnalazione comuni [118]. Inoltre possiedono l'abilità di generare nuovi tumori che fedelmente riproducono il fenotipo della patologia originaria. In questo senso, è stato dimostrato in GBM che le colture di staminali tumorali mediante neurosfere sono da un punto di vista genetico/molecolare più fedeli al tumore di origine rispetto alle classiche colture primarie aderenti, non arricchite in cellule staminali tumorali [96]. Inoltre, linee stabilizzate di glioma come U87MG e A172, seppur in minor quantità rispetto alla linea U251, e la linea SK-N-SH presentano discrete sottopopolazioni di cellule con caratteristiche staminali. [119].

Questa applicazione deriva dall'estensione dello studio immuno-fenotipico delle cellule del sangue. Infatti, la prima evidenza della presenza e dell'importanza delle CSC nei tumori è emersa proprio da uno studio immuno-fenotipico del sistema ematopoietico in cui cellule tumorali CD34⁺/CD38⁻ isolate da sangue di pazienti con leucemia mieloide cronica erano in grado di rigenerare tumori quando trapiantate in modelli animali.

L'approccio sperimentale basato sull'oncogenicità correlata al grado di espressione di marker di staminalità, quali CD133, nestina, CD44 ed altri, ha permesso di isolare e caratterizzare cellule staminali tumorali anche da tumori solidi, fra cui tumori al seno, colon, pancreas, prostata, rene, ossa, pelle, fegato, ovaio ed alcuni gliomi. Inoltre, CSC sono state ottenute da linee tumorali stabilizzate e da cellule modificate geneticamente.

Queste cellule sono state testate in vitro attraverso vari saggi per verificarne le proprietà staminali. Una costante fra tutte le cellule staminali tumorali isolate fino ad oggi, è quella di avere una elevata oncogenicità, che permette un efficiente impianto tumorale in topi Nod/Scid anche a concentrazioni limite, fino ad arrivare all'estremo, ossia riuscire a generare un tumore corredato dei vari sottotipi cellulari a partire da una singola cellula.

Studi di citofluorimetria basati sullo "side population"-(SP) scatter per mezzo di esclusione di blu di Hoechst 33342, hanno permesso di identificare, e purificare mediante cell sorter, CSC da vari tipi di biopsie e linee cellulari [80, 120]. Le cellule SP hanno una maggiore efficienza nell'espellere il colorante, grazie ad una maggiore espressione di proteine trans-membrana che favoriscono la fuoriuscita del colorante verso l'esterno. Questi trasportatori sono gli stessi responsabili del flusso in uscita dei farmaci, come i trasportatori *ATP-binding cassette* (ABC), proteine della famiglia multi-drug resistance (MDR).

La popolazione SP delle linee di Neuroblastoma è stata equiparata al tipo-I delle linee di Neuroblastoma in base al potenziale differenziativo ed alla capacità di auto-rinnovamento. Inoltre, questa sottopopolazione esprimeva alti livelli di marker staminali ed aveva una elevata abilità di proliferazione concludendo che le cellule SP della linea SK-N-SH avevano proprietà staminali e potevano corrispondere al tipo-I [121], descritto in precedenza.

Alcuni autori hanno proposto un metodo di induzione e arricchimento tramite NSC SFM basato sulla morfologia cellulare delle colonie formate dalle linee in vitro. Gli autori hanno dimostrato che una esigua sottopopolazione di linea di neuroblastoma, che in DMEM completo cresceva e si organizzava in modo anomalo formando colonie aderenti strettamente impacchettate e di

forma circolare (e non classico tappeto cellulare), era capace di autorinnovamento cellulare, generazione di neurosfere in NSC SFM e potenziale differenziativo multilinea verificato mediante positività ai marker astrocitari, oligodendrocitari e neuronali. La crescita in NSC SFM di sottopopolazioni che presentano l'esclusiva morfologia compatta e circolare ha permesso di mantenere ed allargare colture di linea di glioma U251 sempre più pure in CSC [122].

II. SCOPO DELLA TESI

Obbiettivi

Il lavoro riportato in questa tesi ha avuto come obiettivo primario quello di indagare i cambiamenti morfologici, molecolari e funzionali nella generazione di neurosfere precoci 3-D da linea SF-268 di Astrocitoma anaplastico IV grado (GBM) e linea SK-N-SH di Neuroblastoma, mediante crescita in terreno selettivo privo di siero per cellule staminali neurali (NSC SFM). Il progetto sperimentale si prefiggeva di fornire nuove indicazioni riguardanti alcuni punti chiave dell'oncogenicità, fra cui natura staminale dei tumori, de-differenziamento cellulare verso fenotipi precursori con proprietà staminali e resistenza ai farmaci chemioterapici.

Gli obiettivi specifici del presente lavoro di tesi sono stati i seguenti:

- Allestimento e propagazione di colture 3-D sferoidali da linee tumorali umane stabilizzate SK-N-SH ed SF-268, mediante sub-colture in terreno NSC SFM, selettivo per il mantenimento e la propagazione di CSC e cellule progenitrici neurali.
- Indagine morfologica delle sfere per mezzo di microscopia ottica, SEM e TEM
- Comparazione tra singole cellule derivate dalle sfere in micro-ambiente privo di siero, ipotizzate "stem-like", e corrispondenti linee differenziate, nella risposta al trattamento *in vitro* con Temozolomide mediante saggi con 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide (saggio metabolico MTT).
- Screen differenziale del trascrittoma di sfere precoci a 8 giorni di induzione e linee differenziate, mediante Chip Microarray ed analisi dell'espressione di geni target mediante qPCR.

Lo sviluppo di questi obbiettivi nel breve termine porta ad una maggiore comprensione delle dinamiche funzionali e molecolari che accompagnano la de-differenziazione verso fenotipi con proprietà staminali, tipico ad esempio del programma EMT. Inoltre, i dati di un modello *in vitro* eccezionalmente

similare allo scenario *in vivo*, possono essere prodromo per un approccio di tipo pre-clinico e clinico nella diagnosi, prognosi e ricerca di nuovi bersagli terapeutici nel trattamento dei tumori blastici del SN.

Work-flow del progetto

Il presente lavoro di tesi è composto da un'indagine morfologico-funzionale delle cellule staminali/progenitrici tumorali indotte da linee umane SK-N-SH di Neuroblastoma e SF-268 di Glioblastoma, seguita da una approfondita analisi molecolare per valutare i cambiamenti di espressione genica attribuibili all'arricchimento in cellule staminali/progenitrici tumorali. Le linee SK-N-SH ed SF-268 fatte crescere in DMEM completo in condizioni di aderenza hanno rappresentato in tutti i set i esperimenti la condizione "basale" di non induzione. Per quanto riguarda le induzioni verso il fenotipo staminale, sono state allestite colture - in sospensione e in terreni semi-solidi - delle linee con un terreno privo di siero, specifico per le cellule staminali/progenitrici e denominato NSC SFM (Neural Stem Cell, Serum-Free Medium) con lo scopo di ottenere neurosfere flottanti, ossia aggregati cellulari 3-D arricchiti in cellule staminali/progenitrici tumorali. Da una adeguata dissociazione delle neurosfere, sono state ottenute singole cellule destinate ad una coltura in terreno NSC SFM, in sospensione ed in un mezzo semi-solido, per tempi lunghi. Inoltre cellule indotte ed isolate dalle neurosfere sono state rimesse in coltura in mezzi semi-solidi per 30 giorni con lo scopo di osservare auto-rinnovamento attraverso generazione di nuove neurosfere [123, 124]. Parallelamente, le singole cellule derivanti dalle neurosfere a 8 giorni di induzione e le linee basali sono state trattate con dosi crescenti di TMZ (25-1500 uM con DMSO allo 0,1%) e analizzate per l'attività metabolica attraverso saggi colorimetrici di MTT, determinando in questo modo eventuali differenze nella risposta al trattamento con farmaco chemioterapico.

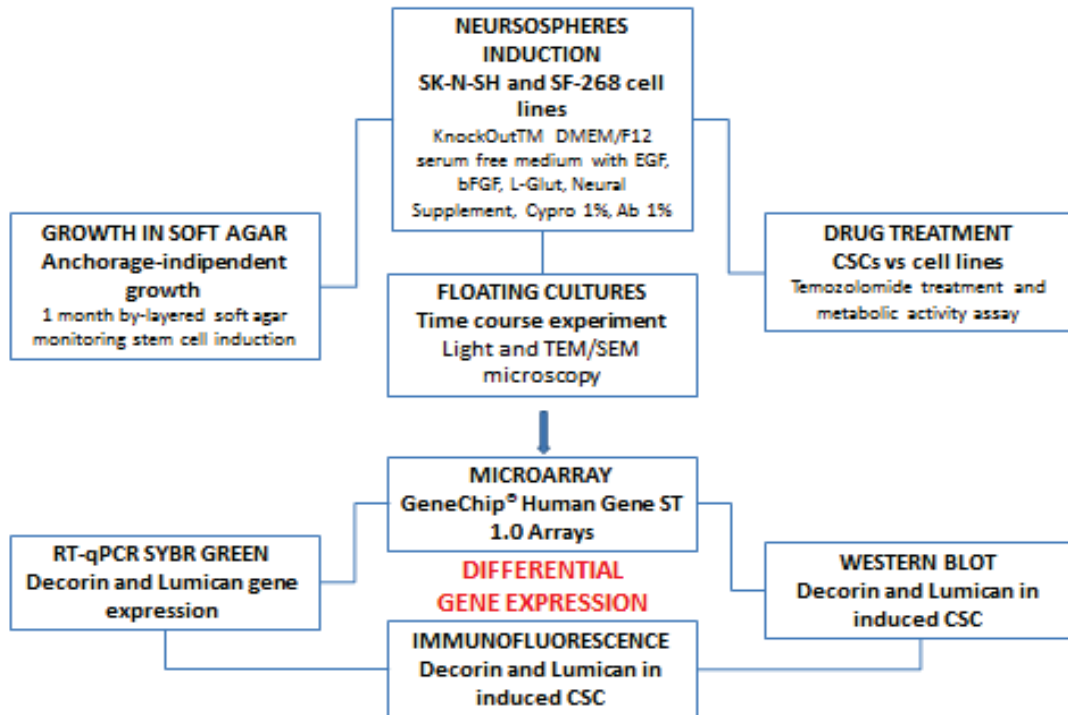


Figura 3 – Work-flow sperimentale del lavoro di tesi

Successivamente sono stati allestiti saggi di espressione genica differenziale fra le linee basali e le linee indotte. In questo contesto è stato scelto di eseguire un'analisi mediante Chip Microarray seguita da validazione quantitativa mediante Real Time qRT-PCR basata sulla chimica del SYBR Green. I prodotti espressi differenzialmente sono stati indagati anche a livello proteico mediante western blot sugli estratti totali ed immunofluorescenza sulle neurosfere a 8 giorni di induzione. In *Fig. 3* è riassunto il disegno sperimentale del progetto.

III. MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Linee cellulari umane SK-N-SH di Neuroblastoma e SF-268 di Glioblastoma e crescita in condizioni di aderenza

Le linee cellulari utilizzate nel presente lavoro di tesi dovevano soddisfare una serie di criteri. Per un confronto istologico/funzionale, le linee dovevano essere rappresentative di forme tumorali di tipo neuronale e gliale; entrambi i tumori di origine dovevano mostrare una organizzazione gerarchica a carattere staminale ed aggressivo, condizione che favorisce e rende applicabile l'induzione e l'arricchimento di linee in cellule staminali tumorali; le linee dovevano essere di tipo epiteliale e non epiteliale, potendo confrontare in questo modo tipi tissutali differenti nella crescita con terreni in sospensione privi di siero. Come riportato nell'introduzione, Neuroblastoma e Glioblastoma Multifforme sono due forme tumorali in cui le cellule staminali/progenitrici con difetti genici hanno un ruolo primario nell'insorgenza, mantenimento e propagazione della massa tumorale. Inoltre entrambi i tumori hanno in comune fenomeni legati alla natura staminale del tumore stesso, fra cui ampia eterogeneità cellulare ed una spiccata resistenza ai farmaci chemioterapici, con conseguente prognosi infausta dei pazienti.

Alla luce di queste premesse, le linee umane immortalizzate SF-268 ed SK-N-SH rispondevano perfettamente ai criteri di selezione per una possibile induzione in cellule staminali tumorali.

La linea cellulare umana immortalizzata SF-268, isolata da una donna di 24 anni precedentemente sottoposta a radioterapia, è rappresentativa di una linea non epiteliale di *Astrocitoma anaplastico* del IV grado WHO, noto anche come GBM, in cui l'oncosoppressore *p53* non viene espresso [125, 126]. Diversamente, la linea cellulare umana SK-N-SH è una linea eterogenea di Neuroblastoma derivante da una bambina di 4 anni, con morfologia epiteliale e crescita cellulare in condizioni di aderenza. La linea è composta da sottopopolazioni rotondeggianti che non aderiscono alla base delle fiasche e sottopopolazioni maggiormente differenziate con fenotipi epiteliali-simili

(adese), caratterizzate in microscopia elettronica dalla presenza di particelle granulose dense con funzione secretoria.

Le linee cellulari sono state fatte crescere in terreno DMEM completo (Sigma-Aldrich), contenente FBS (Sigma-Aldrich) al 10% ed antibiotico/antimicotico all'1x ed incubate a 37°C in un atmosfera con CO₂ al 5%. Il siero veniva precedentemente scomplementato a 56°C in bagnetto termostato per 30 minuti. Il cambio di terreno è stato eseguito ogni 2-3 giorni. Una volta che le cellule raggiungevano la confluenza, monitorata attraverso un microscopio ottico Leyca, veniva aspirato il terreno e sostituito con 5ml di PBS-EDTA per 10 minuti a 37°C per favorire il distaccamento delle cellule. Le cellule venivano dissociate meccanicamente con l'aggiunta di 5ml di PBS, trasferite in tubi da 15ml e sottoposte a centrifugazione a 1600rpm per 5 minuti. Il surnatante veniva eliminato, le cellule risospese in DMEM completo e trasferite in nuove fiasche T75. Una volta ottenuto uno stock attraverso la crioconservazione dei pellet (-80°C, azoto liquido, siero fetale bovino con DMSO al 7%), si è proceduto all'espansione delle linee per avviare gli esperimenti di induzione. Le linee cellulari provengono entrambe dall'American Type Culture Collection (ATCC).

Arricchimento delle linee SK-N-SH e SF-268 in cellule staminali/progenitrici tumorali attraverso la generazione di sfere 3-D in NSC SFM

Come argomentato nell'introduzione, la generazione di neurosfere flottanti in NSC SFM addizionato di fattori di crescita che stimolano il self-renewal risulta ad oggi il metodo più utilizzato nella coltura, nell'induzione, nel mantenimento e nell'identificazione prospettica di cellule staminali tumorali, sia da espianti primari che da pool di linee tumorali umane stabilizzate [96, 117, 127].

Le linee SK-N-SH e SF268 sono state indotte verso un fenotipo staminale attraverso colture flottanti in condizioni di crescita che favorivano la generazione di neurosfere tridimensionali, notoriamente arricchite in cellule

staminali/progenitrici tumorali. Il terreno di induzione aveva lo scopo di stimolare selettivamente la crescita delle cellule staminali/progenitrici attraverso l'aggiunta di fattori specifici. Il terreno utilizzato per l'induzione è un NSC SFM (neural stem cell, serum-free medium), preparato in laboratorio, privo di siero e composto da: KnockOut™ DMEM/F12 (Life Technologies), addizionato di EGF 20ng/ml (Sigma-Aldrich), bFGF 20ng/ml (Sigma-Aldrich), StemPro® Neural Supplement (Life Technologies), L-glutamina 2mM (Sigma-Aldrich) e antibiotico/antimicotico 1x (Life Technologies). Il cambio di terreno è stato eseguito ogni 3 giorni, mediante raccolta di neurosfere in tubi da 15 ml e blanda centrifugazione a 200 rpm per 6 minuti, seguita da un delicato lavaggio 2x con PBS e successiva sub-coltivazione in nuove fiasche. Il terreno veniva preparato fresco ad ogni passaggio per evitare l'inattivazione dei fattori di crescita dovuta ad una limitata emivita degli stessi, soprattutto del supplemento neuronale B27 e dei fattori di crescita dell'epidermide e dei fibroblasti.

In questo contesto è utile sottolineare che non tutte le cellule iniziali, siano esse primarie o di linea, sono in grado di generare neurosfere, infatti l'induzione delle linee con il terreno privo di siero ha dato luogo non solo a neurosfere flottanti ma anche a singole colonie di cellule aderenti alle fiasche. Poter raccogliere le neurosfere flottanti senza la necessità di dover staccare le cellule aderenti, ha permesso di selezionare ed allargare solo le popolazioni arricchite in cellule staminali tumorali eliminando dallo studio le cellule che non lo erano.

Crescita in soft agar

I terreni in mezzi semisolidi permettono la crescita in condizioni indipendenti dall'ancoraggio, peculiarità tipica delle cellule tumorali con maggiore aggressività. Le linee SK-N-SH ed SF-268 sono state fatte crescere in un terreno di agar a doppio strato, sia con il terreno DMEM completo che col terreno NSC

SFM, per valutare la capacità di crescita e di induzione delle neurosfere in un ambiente colturale maggiormente selettivo.

Lo strato inferiore del mezzo era composto da 2 ml/pozzetto di DMEM o NSC SFM con agar allo 0,6%. Il terreno mantenuto a 42°C veniva miscelato ad una soluzione di agar in PBS e velocemente disposto in piastre da 6 pozzetti. Una volta gelificato, veniva preparato lo strato superiore composto da una miscela di 0,5ml di DMEM o NSC SFM con agar allo 0,6% e 0,5ml di DMEM o NSC SFM contenente $2 \cdot 10^3$ cellule.

Un ulteriore saggio in soft agar successivo a tre passaggi in sospensione (2nd soft agar) è stato ripetuto per le singole cellule derivanti da neurosfere SK-N-SH ed SF-268 all'ottavo giorno di induzione, con lo scopo di osservare auto-rinnovamento attraverso generazione di nuove neurosfere [123, 124].

La formazione di colonie (in terreno DMEM) e neurosfere (in terreno NSC SFM) è stata monitorata durante le prime 3 settimane di coltura attraverso un microscopio a fase inversa. Dopo 1 mese le colonie sono state colorate con cristal-violetto allo 0,02% e fotografate.

Caratterizzazione ultrastrutturale e funzionale

Microscopia ottica

La generazione delle neurosfere è stata monitorata durante i primi 12 giorni di induzione in sospensione e tra i 14 ed i 28 giorni di induzione in terreno semi-solido. Sono state acquisite immagini digitali delle neurosfere dal giorno 0 al giorno 12 per mezzo di un microscopio ottico a fase inversa Nikon Eclipse Ti-S equipaggiato di telecamera interfacciata con un personal computer IBM-compatibile. Le foto son state eseguite riducendo al minimo i fenomeni di diffrazione cellulare, massimizzando il numero di pixel per una migliore qualità e con focus rivolto alla circonferenza delle sfere.

Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Per un'analisi morfologica ultra-strutturale, neurosfere provenienti dalle linea di NBL ad 8 giorni di induzione sono state esaminate al TEM ed al SEM. La preparazione dei campioni per il TEM ed il SEM ha previsto una fase iniziale comune. Una volta ottenuti i pellet delle neurosfere (senza centrifugazione) in provette da 1,5 ml, si è proceduto con la fissazione in presenza di glutaraldeide al 2,5% in PBS 0,1M per 2 ore a 4°C seguita da 4 lavaggi con PBS e post-fissazione con tetrossido di osmio all'1% in PBS 0,1M per 1 ora a 4°C. Il tetrossido di osmio è un potente agente ossidante che viene utilizzato per marcare i componenti lipidici della cellula ottenendo un buon contrasto in microscopia elettronica. A questo punto si è proceduto con la disidratazione dei campioni. I pellet son stati trattati con acetone al 60% per 25 minuti (5 cambi da 5 minuti ciascuno) e acetone assoluto per altri 25 minuti (sempre 5 cambi da 5 minuti ciascuno). Successivamente, i campioni destinati alle analisi al TEM son stati inclusi in resina (Durcupan ACM FLUKA) attraverso trattamenti successivi con una soluzione 1:1 di resina e acetone

per 20 minuti a 60°C, una soluzione 3:1 di resina e acetone per 20 minuti a 60°C, resina assoluta per 20 minuti a 60°C ed infine l'inclusione finale in resina assoluta over-night a 60°C. Sezioni ultrafini delle inclusioni in resina, ottenute all'ultramicrotomo Reichert Jung, dopo essere state contrastate con citrato di piombo ed acetato di uranile, sono state osservate e fotografate al TEM ZEISS EM 902°.

Microscopia elettronica a scansione (SEM)

I campioni per il SEM, hanno avuto lo stesso trattamento dei campioni destinati al TEM con la differenza che, in seguito a disidratazione, hanno subito un trattamento con una soluzione 1:1 di acetone e esametildisilazano per 60 minuti (2 cambi da 30 minuti ciascuno), seguita da un'incubazione con esametildisilazano assoluto per 60 minuti (2 cambi da 30 minuti ciascuno). Le provette sono state lasciate aperte over-night per permettere la completa evaporazione dell'esametildisilazano. Successivamente, i campioni sono stati citocentrifugati su vetrino a 200rpm per 8 minuti e metallizzati con oro palladio. I campioni sono stati osservati e fotografati al SEM FEI Quanta 200.

Trattamento con Temozolomide e saggio MTT

La resistenza ai farmaci chemioterapici è una caratteristica propria dei tumori maligni ed è in stretta relazione al grado di organizzazione strutturale e molecolare delle cellule. Numerose indagini riportano inoltre una chiara associazione tra la farmacoresistenza cellulare ed il grado di staminalità ed eterogeneità delle cellule coinvolte, nonostante per la TMZ, farmaco d'elezione nel trattamento del GBM e con numerose sperimentazioni in casi di NBL incurabili, siano stati riportati in letteratura dati discordanti (si rimanda all'introduzione).

Con lo scopo di valutare l'effetto della TMZ sulle linee indotte con NSC SFM, sono stati allestiti una serie di saggi colorimetrici con 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT). In questo saggio, la formazione di cristalli di formazano da parte degli enzimi metabolici che reagiscono con l'MTT è direttamente proporzionale al grado di attività metabolica delle cellule.

Per gli esperimenti, sono state propagate quantità sufficienti di cellule SF-268 e SK-N-SH in terreno DMEM e relative neurosfere in NSC SFM. All'ottavo giorno di induzione in NSC SFM, le neurosfere di entrambe le linee sono state raccolte, dissociate mediante trattamento con Accutase per 15 minuti a 37°C e risospese in terreno preparato sul momento. Successivamente, singole cellule derivanti dalle neurosfere ad 8 giorni di induzione ed ipotizzate stem-like, e singole cellule derivanti dalle colture in aderenza sono state inoculate in multiwell da 24 pozzetti, con 1 ml di terreno NSC SFM e DMEM rispettivamente, ad una concentrazione di $5 \cdot 10^3$ cellule/pozzetto. Il giorno seguente, le colture sono state trattate con 12 dosi crescenti di TMZ (0-2000 μm), tenendo conto di 6 repliche per ogni condizione, ed incubate a 37°C al 5% di CO₂. Oltre alle condizioni sperimentali, sono stati presi in considerazione il "bianco" (trattamento senza cellule) ed il controllo negativo (cellule senza trattamento). Dopo 72h di incubazione, il terreno è stato rimosso, rimpiazzato con terreno fresco addizionato di TMZ. Al sesto giorno di incubazione, il terreno è stato rimosso delicatamente ed è stato aggiunto 1 ml di una soluzione di MTT (0,5 mg/ml) (Sigma) in DMSO. Dopo un incubazione di 4 h a 37°C, i sali di formazano generati dall'MTT sono stati risospesi vigorosamente con isopropanolo. Infine, è stata determinata l'assorbanza della soluzione ad una lunghezza d'onda di 570 nm con sottrazione del background a 620 nm.

Analisi molecolari

Estrazione dell'RNA e reazione di retrotrascrizione

L'RNA che successivamente sarebbe servito per la reazione di retrotrascrizione a cDNA è stato estratto mediante il kit RNeasy (Qiagen) e la qualità controllata mediante kit RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies), secondo le istruzioni del produttore. Il DNA complementare (cDNA) è stato preparato a partire da 3 µg di RNA cellulare totale seguendo il protocollo M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen). In tubi da microcentrifuga nucleasi-free sono stati aggiunti l'RNA, 1 µg di oligo (dT)₁₂₋₁₈, 1 µl di dNTPs (deossi nucleotidi tri-fosfato) mix (10mM ciascuno dATP, dGTP, dCTP, dTTP a pH neutro) e acqua distillata Rnase-DNase free sino ad un volume di 12 µl; la miscela è stata scaldata per 5 minuti a 65°C e successivamente si è aggiunta la seguente miscela: 4 µl di 5X First-Strand Buffer, 2 µl di DTT (ditiotritolo), 1 µl di Rnase OUT (40 U/µl -inibitore di ribonuclease ricombinante). La soluzione così ottenuta è stata incubata per 2 minuti a 37°C, quindi è stato aggiunto 1 µl (200 U) di M-MLV RT. La miscela di retrotrascrizione così ottenuta è stata incubata a 37°C per 50 minuti, seguita da 15 minuti a 70°C per inattivare la reazione. Nella reazione di retrotrascrizione sono stati allestiti per ogni campione anche i corrispettivi RT-, con lo scopo di verificare la presenza di eventuale DNA contaminante.

Chip Microarray Affymetrix

L'analisi dell'espressione genica differenziale fra le cellule delle neurosfere a 8 giorni di induzione in terreno DMEM/F12 modificato privo di siero e le controparti SK-N-SH e SF-268 in condizioni di aderenza in terreno DMEM completo, è stata effettuata mediante tecnologia Affymetrix Microarray in cui il cDNA totale delle cellule veniva ibridizzato alle sonde del chip contenente

l'intero trascrittoma umano. I processi di ibridazione delle sequenze geniche e della scansione del chip son stati effettuati presso il Centro Pfizer dell'Università di Granada - Giunta di Andalusia di Genomica e Ricerca Oncologica (GENYO) e secondo le istruzioni del produttore. I profili di espressione genica son stati ottenuti mediante il GeneChip® Human Gene ST 1.0 Arrays (Affymetrix Inc.). Per l'allestimento dei chip, 1ug di RNA di alta qualità con RIN compreso tra 7.0 e 10.0, è stato trattato con DNAsi e retrotrascritto con lo scopo di sintetizzare cDNA a doppio filamento. I cDNA sono stati successivamente processati come descritto nelle istruzioni del produttore per poter generare cRNA marcati con biotina, ossia sequenze nucleotidiche a singolo filamento derivanti dai cDNA e marcate con una molecola capace di generare un segnale quantitativo in caso di ibridazione. I prodotti son stati purificati, introdotti nei chip e finalmente scansionati attraverso lo strumento Gene-Chip Scanner 3000 7G (Affymetrix Inc.).

RT-PCR

Per una preliminare analisi dell'espressione genica di decorina (DCN) e lumicano (LUM) nelle linee indotte a 4, 8 e 12 giorni, sono state eseguite reazioni di PCR classica mediante amplificazione con REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich) e successiva corsa elettroforetica dei prodotti di PCR in gel d'agarosio al 2%. La reazione di PCR è avvenuta in un volume totale di 25 ul, composto da 12,5 ul di REDTaq MIX, 1 ul di primers forward e reverse, 5 ul di cDNA e 6,5 ul di H₂O libera da DNAsi e RNAsi.

Il programma della PCR era il seguente: 94°C per 30 secondi, 55°C per 30 secondi e 72°C per 30 secondi ripetuti 35 volte, seguiti da 72°C per 7 minuti. La soluzione del gel d'agarosio è stata ottenuta sciogliendo 0,6 g di agarosio ultrapuro in 30ml di TAE 1x (Tris/acetato 0,04 M; EDTA 0,001 M) in fornello a microonde e versata nell'apparato del gel. Successivamente sono stati caricati 10 ul di Ladder Marker (Sigma-Aldrich) nel primo pozzetto e 20 ul di prodotti di PCR di ogni campione nei pozzetti successivi e sottoposti a corsa

elettroforetica a 80V per 1 ora. Terminata la corsa, il gel è stato incubato in una soluzione di TAE 1X e bromuro d'etidio (0,01%) in agitazione per 5 minuti e sottoposto all'analisi ed acquisizione delle immagini mediante Versadoc™ Imaging System.

Real Time PCR quantitativa con doppio housekeeping (qRT-PCR)

I dati dei Chip Microarrays son stati confrontati con quelli ottenuti mediante Real Time qRT-PCR basata sulla chimica SYBR Green. La qRT-PCR ha permesso di quantificare in tempo reale i prodotti della DNA polimerasi mediante acquisizione ciclo-dipendente del segnale fluorescente emesso dal SYBR® Green I, intercalandosi nel duplex di DNA. La specificità dei prodotti amplificati è stata monitorata attraverso curva di melting, successiva alle reazioni di amplificazione. Il ciclo di amplificazione in cui il segnale fluorescente è maggiore rispetto al valore basale (threshold) viene definito Ct (Cycle threshold).

L'analisi dell'espressione genica è stata condotta su trascritti totali di neurosfere SK-N-SH ed SF-268, a 4, 8 e 12 giorni di induzione con terreno NSC SFM e di linee basali con terreno DMEM per i geni DCN e LUM, come suggerito dal Chip Microarray, e per la β -Actina e la GAPDH come geni di riferimento interno (*housekeeping gene HKG*). I primers utilizzati erano specifici per tutte le varianti di DCN (5 splicing alternativi) e LUM (2 splicing alternativi).

Nel controllo negativo sono stati utilizzati 3 ul di acqua RNAsi free al posto del cDNA. L'amplificazione è stata eseguita per mezzo dello strumento CFX96™ Real-Time PCR Detection System (BioRAD) con il seguente programma: 2 minuti a 50°C per l'attivazione dell'enzima UDG, 2 minuti a 95°C per l'attivazione della AmpliTaq® DNA Polimerasi e 42 cicli di denaturazione, appaiamento ed estensione a 95°C (30 secondi), 56°C (30 secondi) e 72°C (40 secondi) rispettivamente, seguiti da curva di melting, range 56_95°C, incremento di 0,5°C ogni 5 secondi per valutare la specificità

della reazione. Il settaggio della Real Time PCR, la mix di reazione per ciascun campione e le sequenze dei *primer* sono riportate in *Tab. 1*.

I dati sono stati analizzati mediante il metodo di quantificazione relativa dell'algoritmo della derivata seconda. Tale metodo consente di valutare le differenze nei livelli di espressione di un gene tra un trattamento ed il relativo controllo (non induzione), in relazione ad uno "standard interno", espresso costitutivamente in entrambe le condizioni, in questo caso la GAPDH e la β -Actina.

Tabella 1 – Settaggio della Real Time qRT-PCR per la quantificazione dell'espressione genica di decorina e lumicano con standardizzazione su 2 HKG. a. Sequenza di primers. b. Mix di reazione per ciascun campione. c. Programma della reazione.

a		b							
Gene	Primer	Componenti	V _{finale}	C _{finale}	C _{iniziale}				
DCN	F 5'-GGACCGTTTCAACAGAGAGG-3'	SYBR® Master Mix	10 ul	1x	2x				
	R 5'-GACCACTCGAAGATGGCATT-3'								
LUM	F 5'-TGGAGGTCAATCAACTGAGAA-3'					Primer forward	0,4 ul	200 nM	4uM
	R 5'-CAAACGCAAATGCTTGATCTT-3'					Primer reverse	0,4 ul	200 nM	4uM
GAPDH	F 5'-CAAGGAGTAAGACCCCTGGAC-3'					H ₂ O	6,2 ul		
	R 5'-TCTACATGGCAAATGTGAGGAG-3'	cDNA	3 ul	4,5 ng/ul	0,03 ug/ul				
B-ACTIN	F 5'-GGCATCCTCACCCCTGAAGTA-3'	Totale	20 ul						
	R 5'-AGGIGTGGIGCCAGAITTTC-3'								

c				
Step	Temperatura	Durata	Cicli	
Attivazione UDG	50°C	2:00	-	
AmpliQ DNA Polimerasi, UP activation	95°C	2:00	-	
Denaturazione	95°C	0:30	42 volte	
Annealing	56°(dcn,lum,gapdh)-60°C(β -actina)	0:30		
Estensione	72°C	0:30		
Curva di Melting	60°C-95°C	0:05	Incremento 0,5°C/0:05	

Per ogni campione (analizzato in triplicato) sono stati calcolati i valori medi di Ct dei geni DCN e LUM, il valore di Δ Ct dei geni rispetto alla GAPDH e rispetto alla β -Actina per ogni singola condizione (0, 4, 8 e 12gg di induzione) il valore di $\Delta\Delta$ Ct fra le varie condizioni e le deviazioni standard per le analisi statistiche dei dati. Per l'analisi dell'espressione genica sono state applicate la formule $FC = \log 2^{-\Delta\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta Ct} * 1000$, dove FC corrisponde al fold change, ossia l'aumento, espresso in numero di volte di DCN e LUM nelle linee indotte

rispetto alle linee basali, normalizzato all'espressione di GAPDH o β -Actina, e $\Delta\Delta Ct$ è la differenza fra i ΔCt delle induzioni (4, 8 e 12 gg) ed il ΔCt della condizione basale (linee non indotte mantenute in colture DMEM); essendo il $\Delta\Delta Ct$ della condizione basale uguale a zero (nullo), l'espressione matematica $2^{-\Delta\Delta Ct}$ delle linee basali è uguale ad 1. Con tale metodo, la quantità di DCN e LUM delle linee indotte a 4, 8 e 12 giorni è stata espressa come FC, e riportata in grafico in scala logaritmica. Diversamente, la formula $2^{-\Delta Ct \cdot 1000}$, ha permesso di confrontare la modulazione dei livelli di espressione di DCN e LUM all'interno della stessa condizione.

Western Blot

Gli estratti proteici cellulari totali di linee basali e sfere a 4, 8 e 12 giorni di induzione sono stati preparati mediante sonicazione pulsata per 5 minuti in buffer di lisi (0,302 g Trizma-base, 4,29 g Saccarosio, 0,073 g EDTA pH 7,4, 0,5 % TRITON 100X, 1% mammalian protease inhibitor). 70 ug di estratto proteico sono stati separati mediante SDS-PAGE (10% acrilamide-bis acrilammide) e trasferiti su membrana di nitrocellulosa da 0,45 um (Amersham Hybond, GE Healthcare) mediante lo strumento Trans-blot SD Semi-dry Transfer cell (Bio-rad). I blotting sono stati saturati per prevenire il legame aspecifico degli anticorpi alla membrana con una soluzione bloccante di latte scremato in polvere al 5% in PBS e 0,1 % di Tween®20 (Sigma Aldrich), quindi incubati *over night* con ognuno dei seguenti anticorpi primari: anti-DCN (1:100 in soluzione di blocking, monoclonale in mouse, Santa Cruz), anti-LUM (1:100 in 5% di PBS- Tween®20, policlonale in rabbit, Santa Cruz). L'anticorpo diretto contro la Beta Actina (1:50000 in soluzione di blocking, monoclonale in mouse, Sigma Aldrich) è stato scelto come controllo del caricamento delle proteine; tale scelta, rispetto all'uso della GAPDH come HKG, è stata dettata dalla variabilità di espressione di quest'ultima osservata nella RT-qPCR. Per il rilevamento degli anticorpi primari sono stati utilizzati anticorpi secondari *goat anti-mouse* ed *anti rabbit*

(1:100000 in soluzione di blocking, Pierce-Thermo Scientific) coniugati con con perossidasi di rafano ed esposti ad una soluzione contenente il suo substrato (Pierce ECL Solutions-Thermo Scientific); la rilevazione dell'attività enzimatica della perossidasi di rafano che da un prodotto chemiluminescente è stata effettuata con lo strumento VersaDoc (Bio-rad).

Analisi dei dati

I dati dei microarray sono stati processati con il software GeneChip Operating Software 1.4 GCOS (Affymetrix Inc.). Per le correzioni del background e l'analisi dei risultati son state utilizzate trasformazioni stabilizzanti della varianza e normalizzazione dei dati (trasformazione Log^2) mediante l'arrayQualityMetrics (Bioconductor software). I risultati mostrano l'aumento espresso in fold-change tra le cellule staminali tumorali indotte e le linee di origine. Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione genica mediante qRT-PCR, i fold-change derivano dalla formula $FC=2^{-\Delta\Delta C_t}$. Tutti i dati vengono espressi come media \pm errore standard. Dove necessaria, l'analisi statistica è stata condotta mediante test di Student. I risultati ottenuti sono stati considerati statisticamente significativi per un valore di $p < 0.05$.

IV. RISULTATI

Linee SK-N-SH ed SF-268 generano neurosfere 3-D in NSC SFM in mezzi liquidi e semi-solidi

L'utilizzo degli stessi terreni di coltura per entrambe le linee, sia per la condizione di induzione delle neurosfere che per la condizione basale di riferimento, ha consentito di ottenere risultati maggiormente confrontabili e con meno "rumore di fondo" attribuibile a condizioni sperimentali discordanti.

Le linee hanno mostrato una buona capacità di crescita in condizioni di aderenza in DMEM, con alcune cellule adese alle piastre ed altre flottanti (*Fig. 4*). Il terreno basale ha permesso di far crescere in aderenza anche la linea SF-268, nonostante non sia di tipo epiteliale.

La linea SK-N-SH mostrava in terreno DMEM sottotipi cellulari discriminabili per morfologia, dimensione e grado di impaccamento con altre cellule mentre la linea SF-268 appariva uniforme. La linea SK-N-SH ha mostrato un tasso di duplicazione di circa 2 giorni mentre le cellule SF-268 replicavano meno velocemente (circa 70 ore).

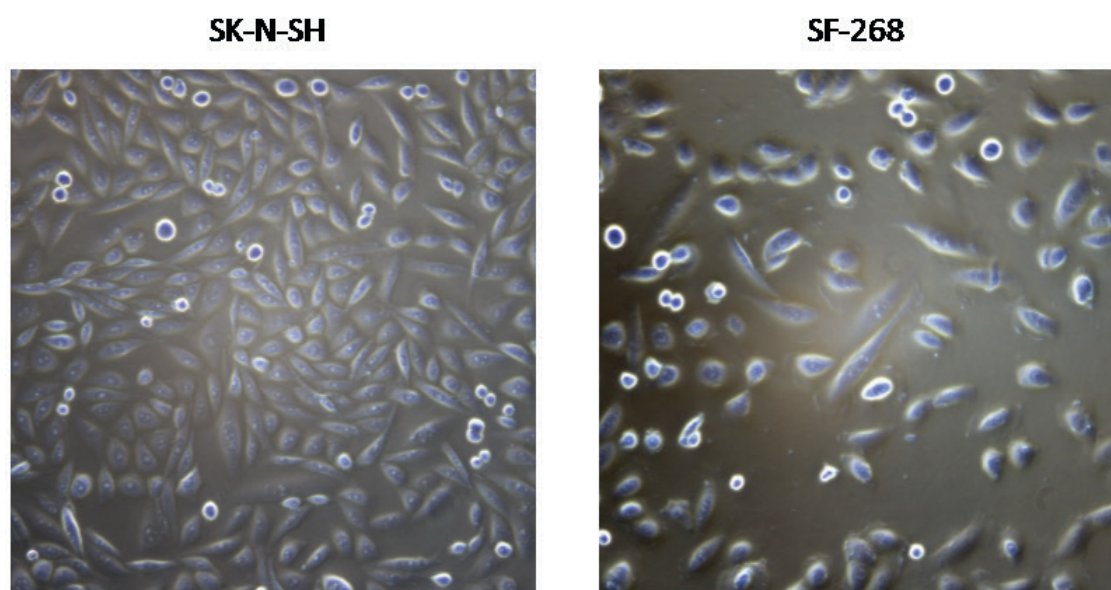


Figura 4 – Linee umane SK-N-SH di Neuroblastoma ed SF-268 di Glioblastoma in condizioni di aderenza in terreno DMEM. Microscopio a fase inversa Nikon Eklipse 2000-s 20x

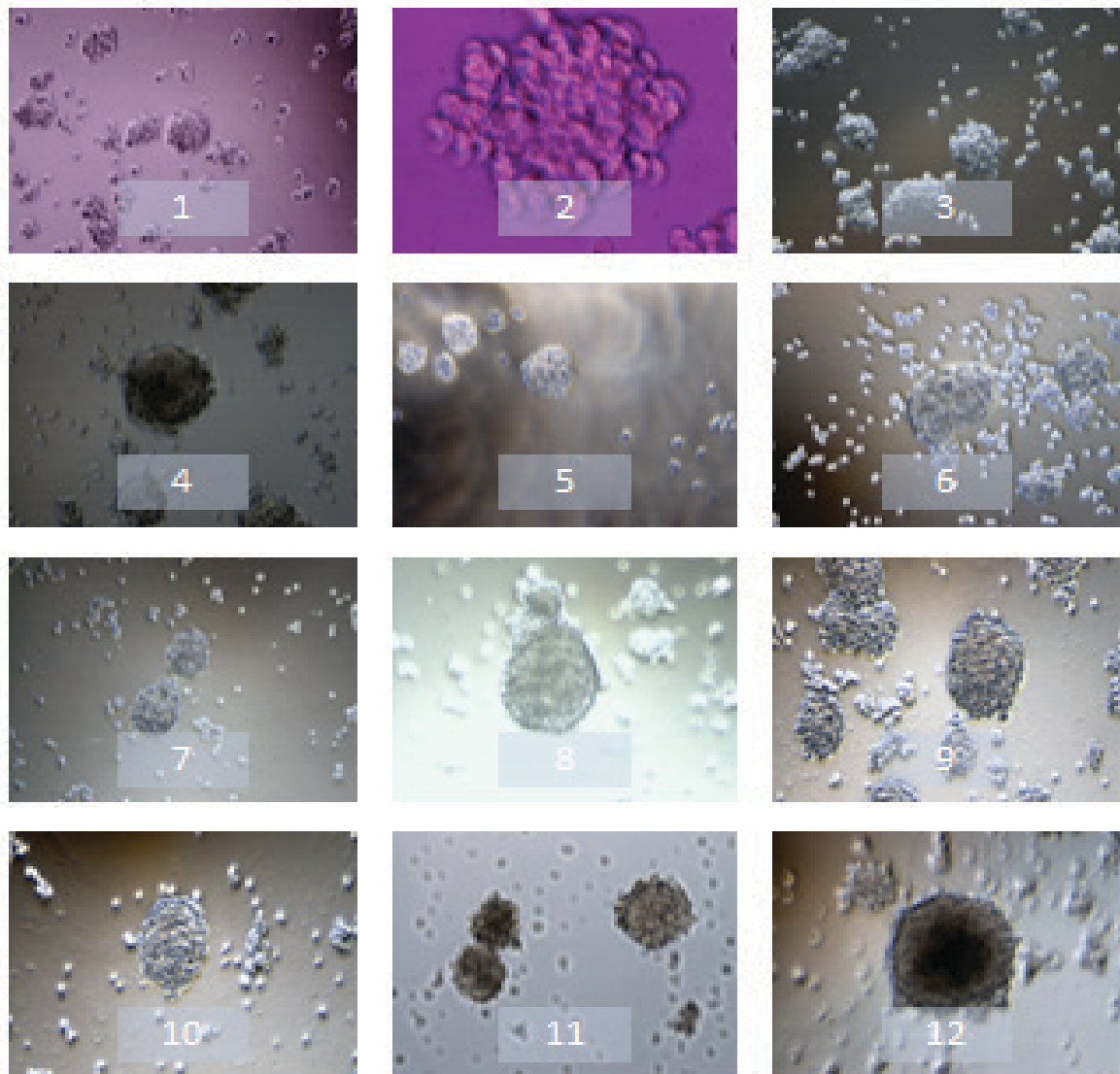


Figura 5 – Induzione di neurosfere dalla linea SF-268 - Nikon Eklipse 2000-S - 1-12 giorni di induzione in terreno NSC SFM.

Nell'induzione in fenotipi staminali mediante la generazione di neurosfere, entrambe le linee cellulari hanno mostrato una adeguata responsività al terreno NSC SFM ed ai fattori addizionati (EGF, bFGF, NS).

Considerato il tasso di duplicazione delle linee in terreno DMEM e nell'ottica di un confronto con le cellule indotte, nelle colture di neurosfere è stato scelto di effettuare il cambio di terreno ogni 3 giorni, con lo scopo di ottimizzare una costante attivazione mediante apporto continuo di fattori di crescita (breve emivita di EGF ed bFGF).

I prodotti di induzione di entrambe le linee hanno mostrato eterogeneità nella dimensione, morfologia e capacità proliferativa (*Figg. 5 e 6*).

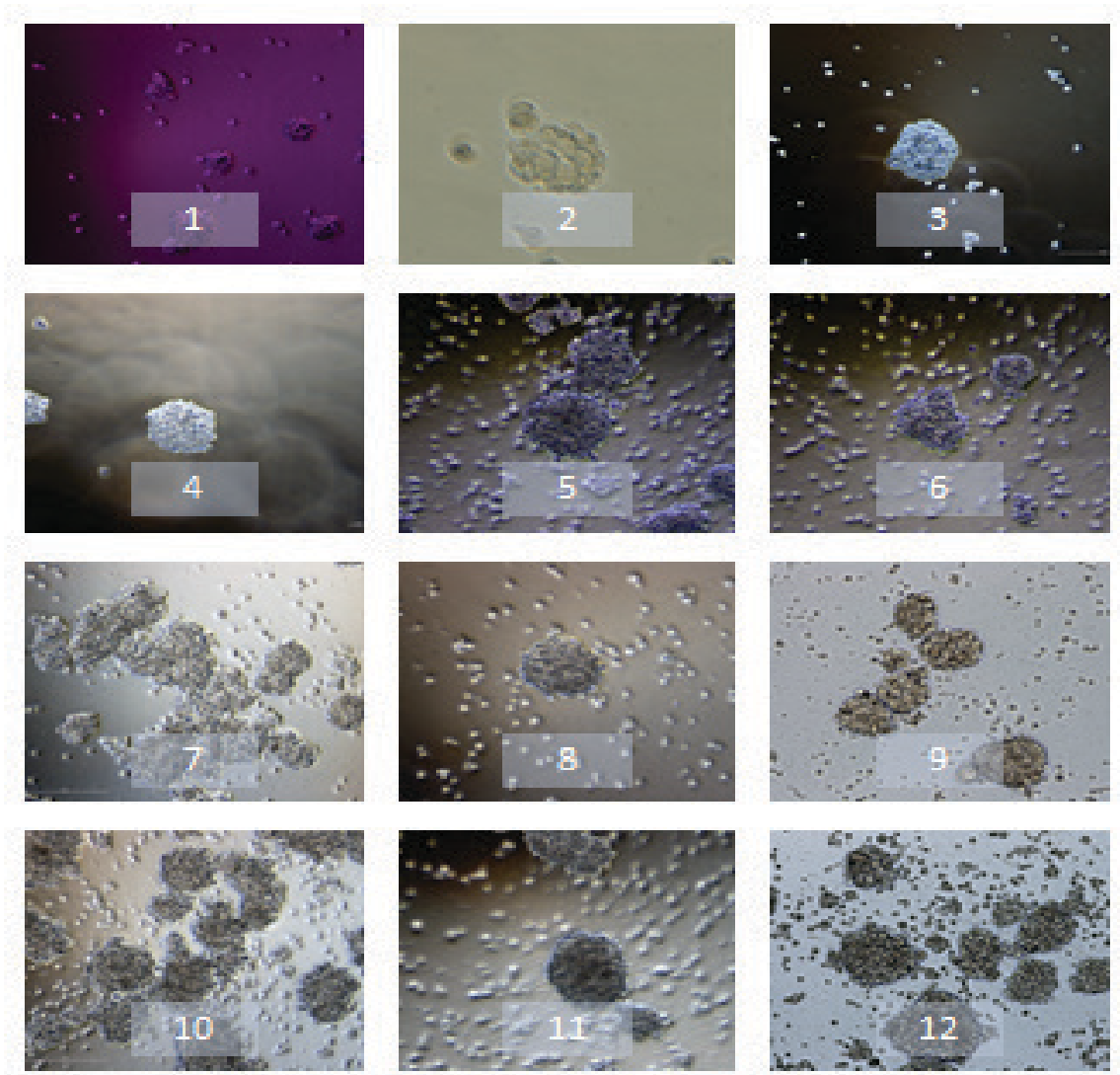


Figura 6 – Induzione di neurosfere dalla linea SK-N-SH - Nikon Eklipse 2000-S - 1-12 giorni di induzione in terreno NSC SFM.

Nell'arricchimento delle linee in tipi cellulari staminali-simili, non tutte le cellule riuscivano a generare neurosfere. Oltre alle sfere, una frazione di cellule isolate andava incontro a morte cellulare (valutata mediante test di esclusione con *trypan blue*) provocata dalla loro incapacità a sopravvivere in terreno selettivo; un altro sottogruppo di cellule permaneva in condizioni di aderenza anche in terreno senza siero; questo fenomeno è da attribuire al grado di differenziazione cellulare, dal momento in cui una cellula estremamente differenziata possiede diversi motivi funzionali e risulta strutturalmente meno ricettiva in un induzione stem-like (de-differenziazione). Per questo motivo, le sfere sono state raccolte selettivamente ad ogni passaggio in sub-culture scartando le cellule

indifferenziate che rimanevano adese alle fiasche. A questo proposito, come si può osservare dalle figure, è utile sottolineare che la formazione del background di cellule adese è stata proporzionale al tempo di induzione in fenotipi staminali-simili. Questo dato andrebbe a favore di una differenziazione cellulare post-induzione e non alla persistenza delle linee in uno stato differenziato dal principio, in quanto, essendo rimosse ad ogni passaggio, le cellule che successivamente aderivano al fondo delle fiasche derivavano necessariamente dalle sfere (migrazione).

Le colture in sospensione di linee SF-268 ed SK-N-SH in esperimenti time-course nei primi 12 giorni di induzione, hanno mostrato che, già in seguito a 24/48 ore, alcune sfere raggiungevano diametri di 40-50 μm ed erano composte da decine di cellule, suggerendo che il tempo di duplicazione delle linee in terreno NSC SFM è minore rispetto alla condizione basale in terreno DMEM.

Questo dato suggerisce che l'effetto precoce del NSC SFM su linee è quello di sostenere la proliferazione cellulare mediante l'attivazione di pathways dell'oncogenicità e della staminalità attraverso l'azione sinergistica di EGF e bFGF.

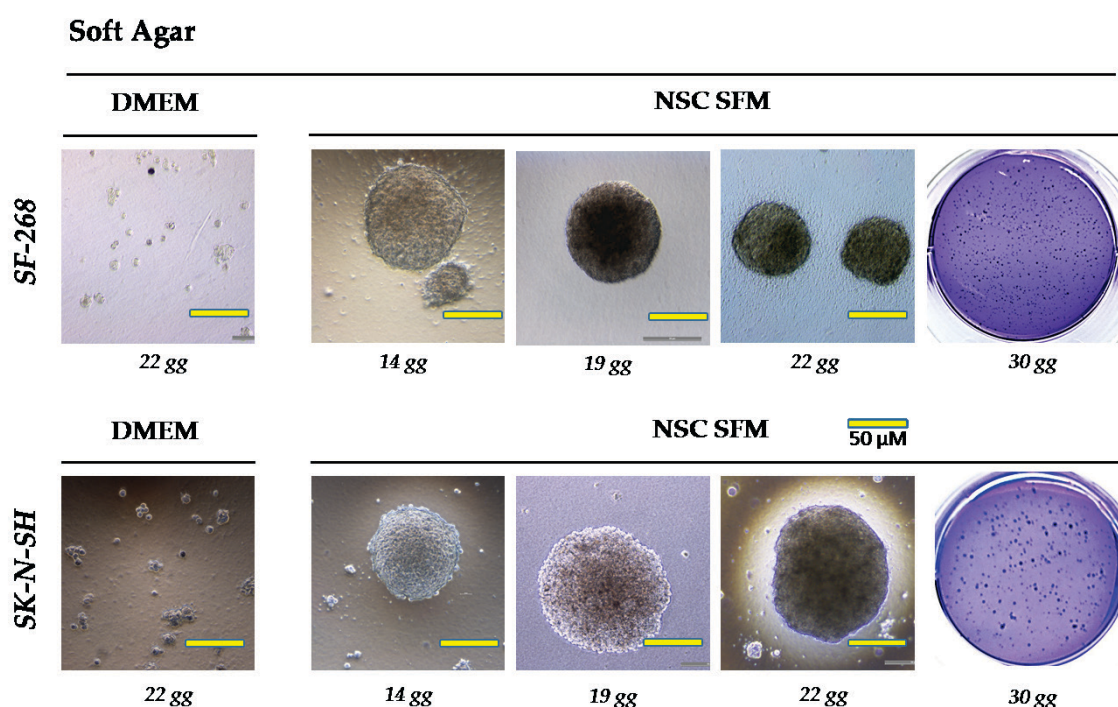


Figura 7 – Induzione di sfere mediante doppio terreno selettivo (Agar + NSC SFM).

Progressivamente, le sfere hanno assunto conformazioni tridimensionali regolari e di grandi dimensioni a causa di una attiva proliferazione nella maggior parte delle cellule presenti.

L'aumento delle dimensioni generava, in maniera proporzionale, un ambiente interno alle sfere sempre più ipossico e povero di fattori di crescita. Infatti, a partire dal quarto giorno di induzione, alcune sfere derivate dalla linea di GBM hanno iniziato a mostrare un *core* scuro ben visibile al centro della struttura tridimensionale, riconducibile alla presenza di apoptosi o necrosi [128]. Nelle colture in sospensione, questo fenomeno è stato osservato anche nelle sfere di linea SK-N-SH, nonostante sia stato di minor portata ed in tempi successivi (*Fig. 6*). In esperimenti preliminari, colture seminate ad elevate concentrazioni generavano fenomeni di adesione e fusione fra le sfere.

In un mezzo semisolido di agar, le cellule sono state in grado di replicare e generare colonie solo in presenza di terreno NSC SFM (*Fig.7 e 8*). Inoltre, le sfere della linea di NBL sono apparse di dimensioni maggiori rispetto alle sfere di GBM, raggiungendo i 200 µm di diametro in sole tre settimane; per contro le sfere di GBM mostravano precoci cori apoptotici, validando l'analisi delle colture in sospensione.

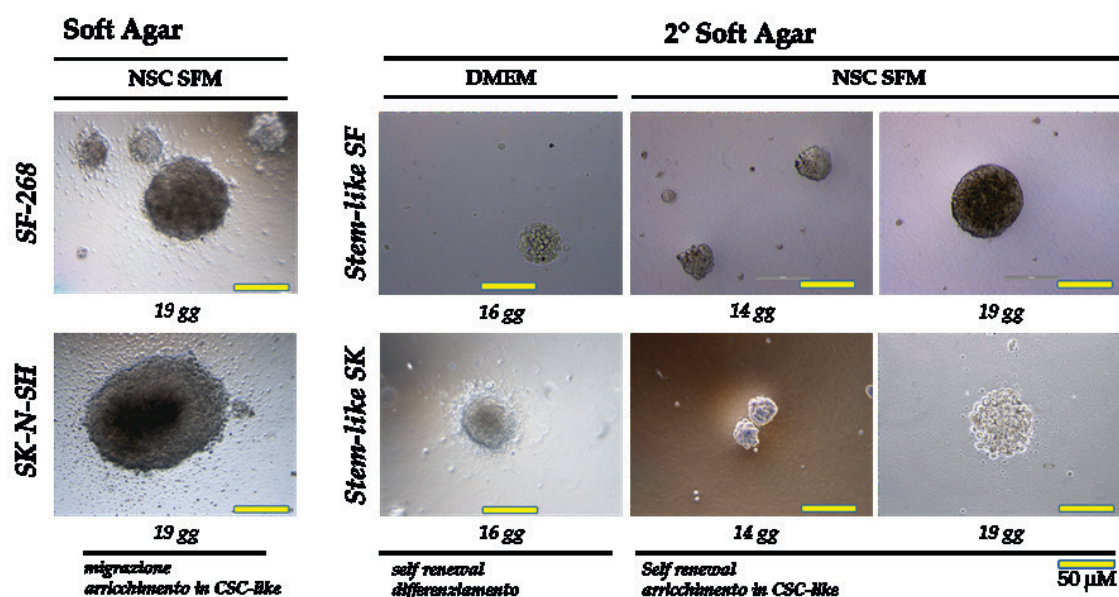


Figura 8 – Crescita in doppio terreno selettivo NSC SFM + Agar in seguito a 3 sub-culture in terreno NSC SFM in sospensione.

I saggi di induzioni secondarie in soft agar hanno evidenziato la capacità delle cellule indotte di generare nuove neurosfere (Fig. 8, a dx), in un terreno doppiamente selettivo in termini di staminalità ed oncogenicità (crescita indipendente dall'ancoraggio). Nella sub-coltura in agar con terreno NSC SFM, le sfere di linea SK-N-SH hanno mantenuto un aspetto translucido, apparentemente privo di segni apoptotici, in seguito ad 1 mese di coltura. Diversamente, le linee SF-268 hanno mostrato anche in soft agar secondario, la presenza del core necrotico solo dopo 2 settimane di coltura. Rari casi di colonie sono stati rilevati anche sottoponendo le colture in sospensione ad una sub-coltura in agar con DMEM, ottenendo coefficienti di generazione di neurosfere estremamente bassi ma comunque indicativi di un *trend* di staminalità conservato nelle linee indotte.

Analisi ultrastrutturale e morfo-funzionale

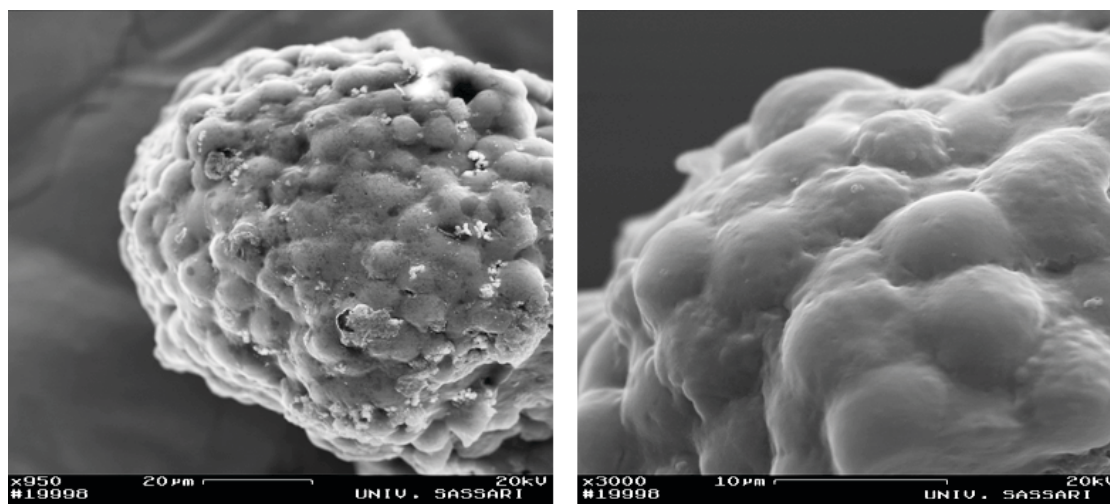


Figura 9 – SEM. Immagini rappresentative di neurosfere SK-N-SH di NBL all'ottavo giorno di induzione in CSC mediante NSC SFM. A sinistra: neurosfera di diametro compresa fra i 60 e i 120 μM . A destra: superficie della neurosfera in cui si possono apprezzare le singole cellule con diametro di circa 8 μm , adese fra loro ed avvolte da uno strato di materiale ECM-simile.

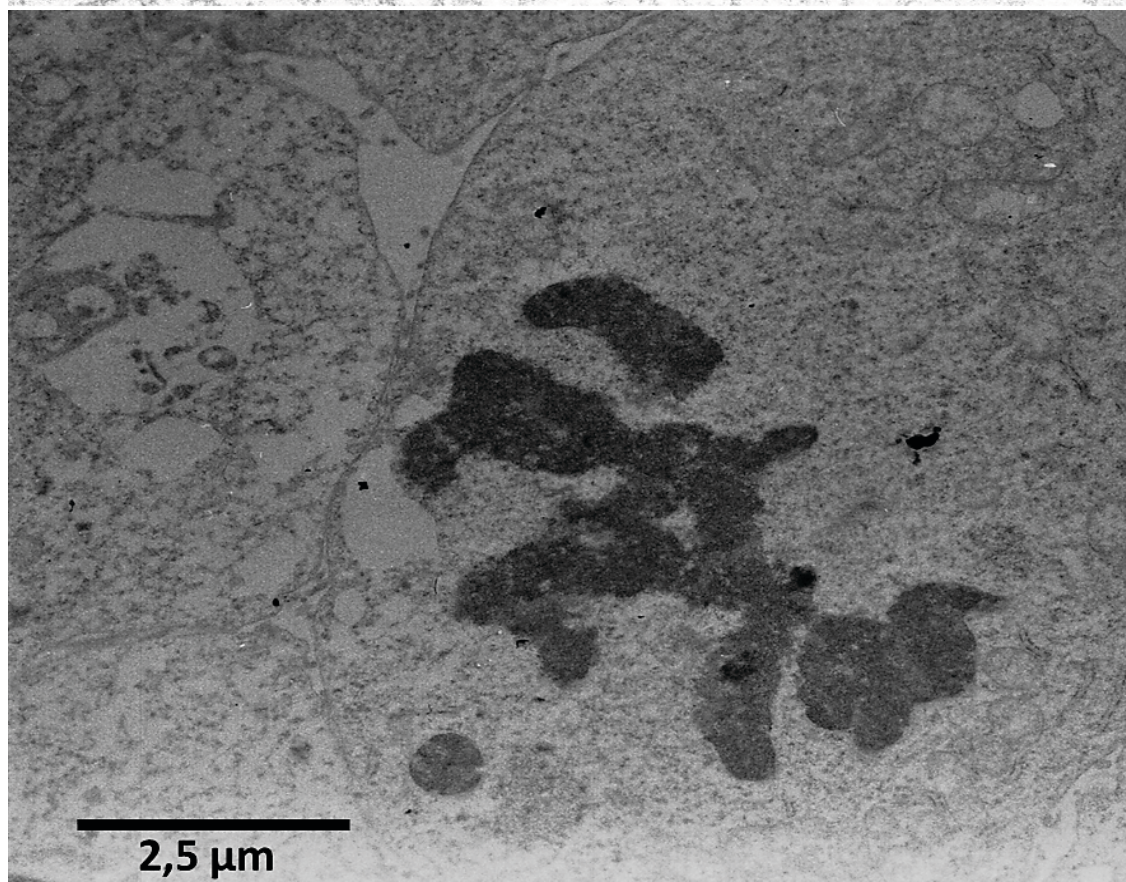
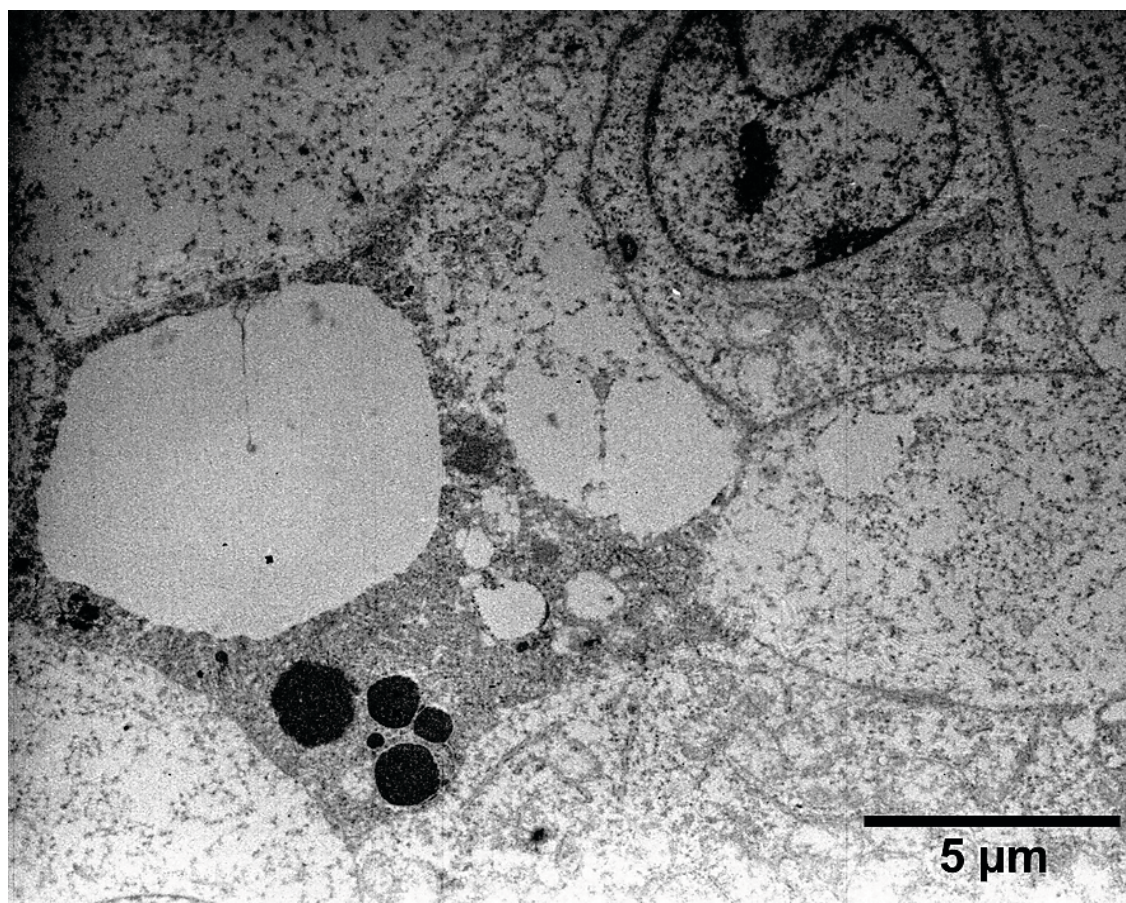


Figura 10 – Cellule in posizione centrale di neurosfere; evidente l'aspetto apoptotico avanzato di una cellula, con cromatina condensata e frammentata in densi vacuoli; accanto ad essa, una cellula morfologicamente normale con nucleo indentato tipico delle cellule tumorali (in alto). Cromosomi in fase di organizzazione pre-metafasica in una cellula in mitosi (in basso).

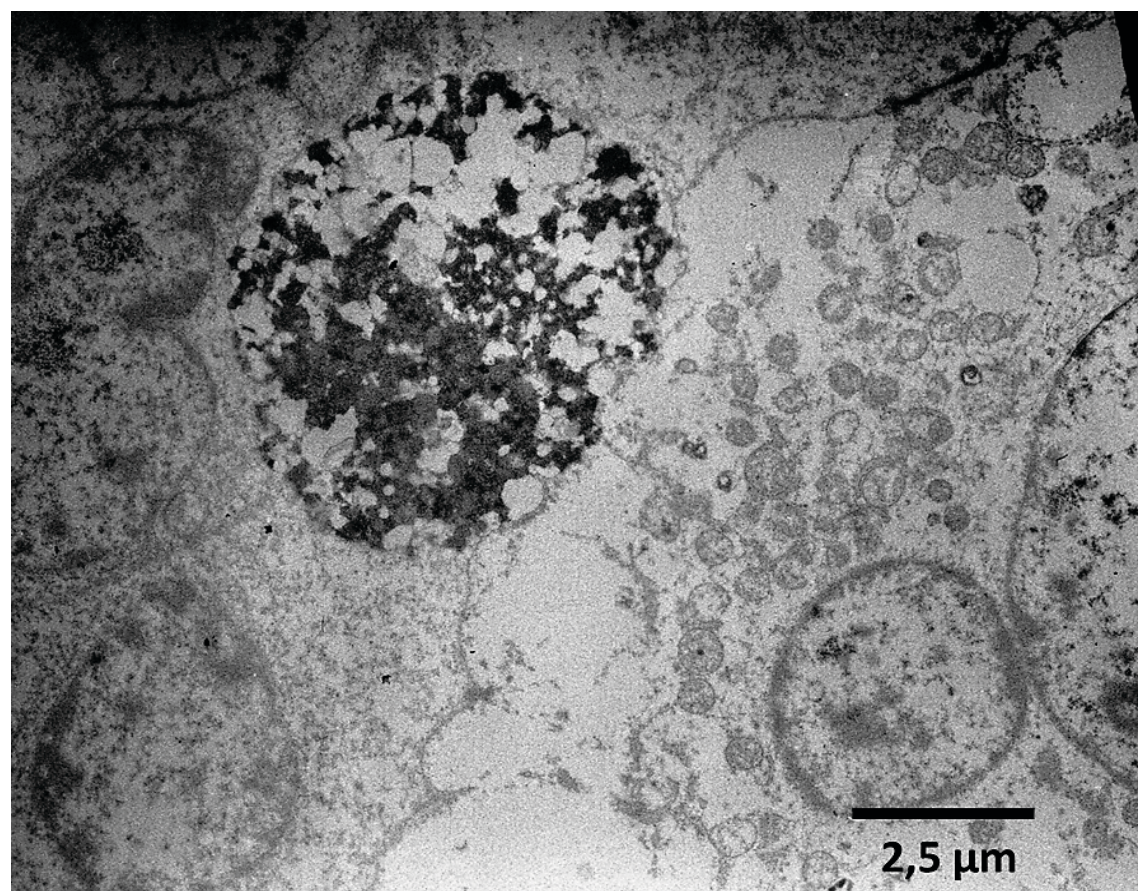
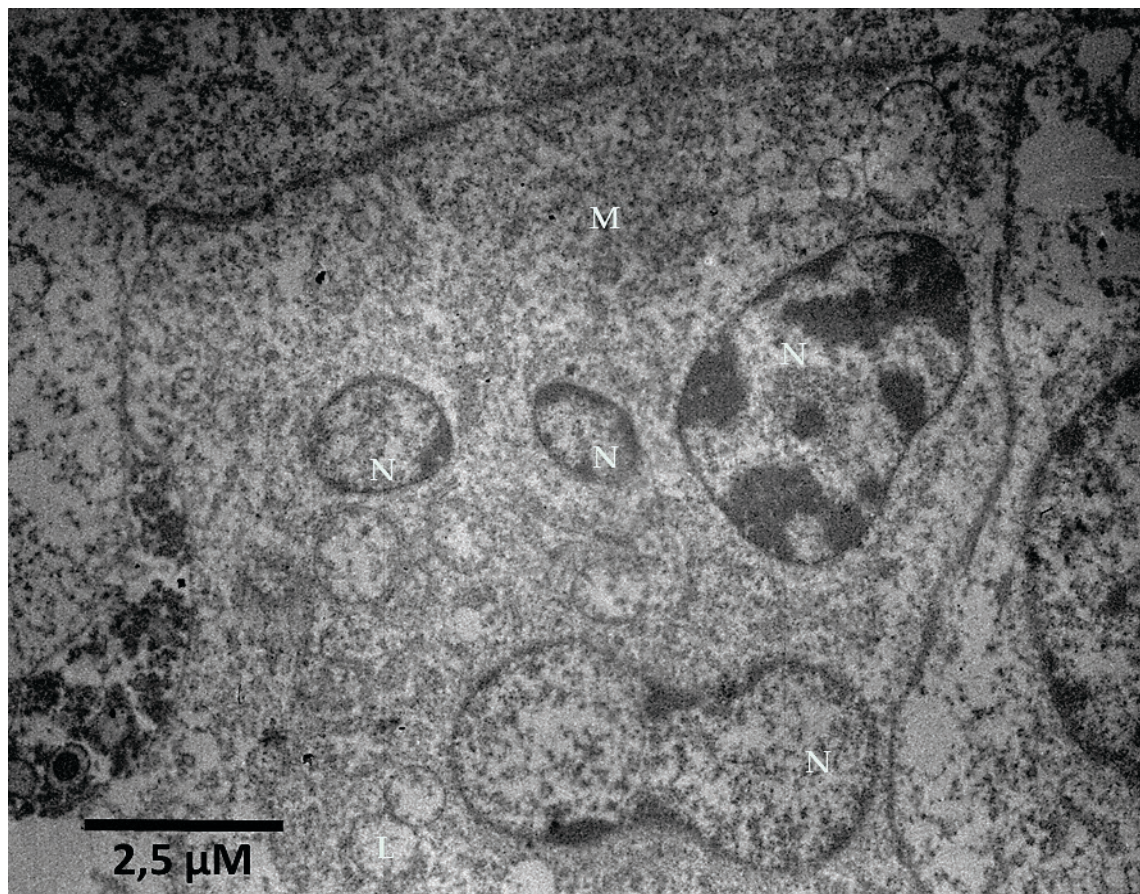


Figura 11 – Fenomeni di morte cellulare interni alle sfere. Apoptosi (in alto). Necrosi (in basso). Notare il rigonfiamento degli organelli citoplasmatici.

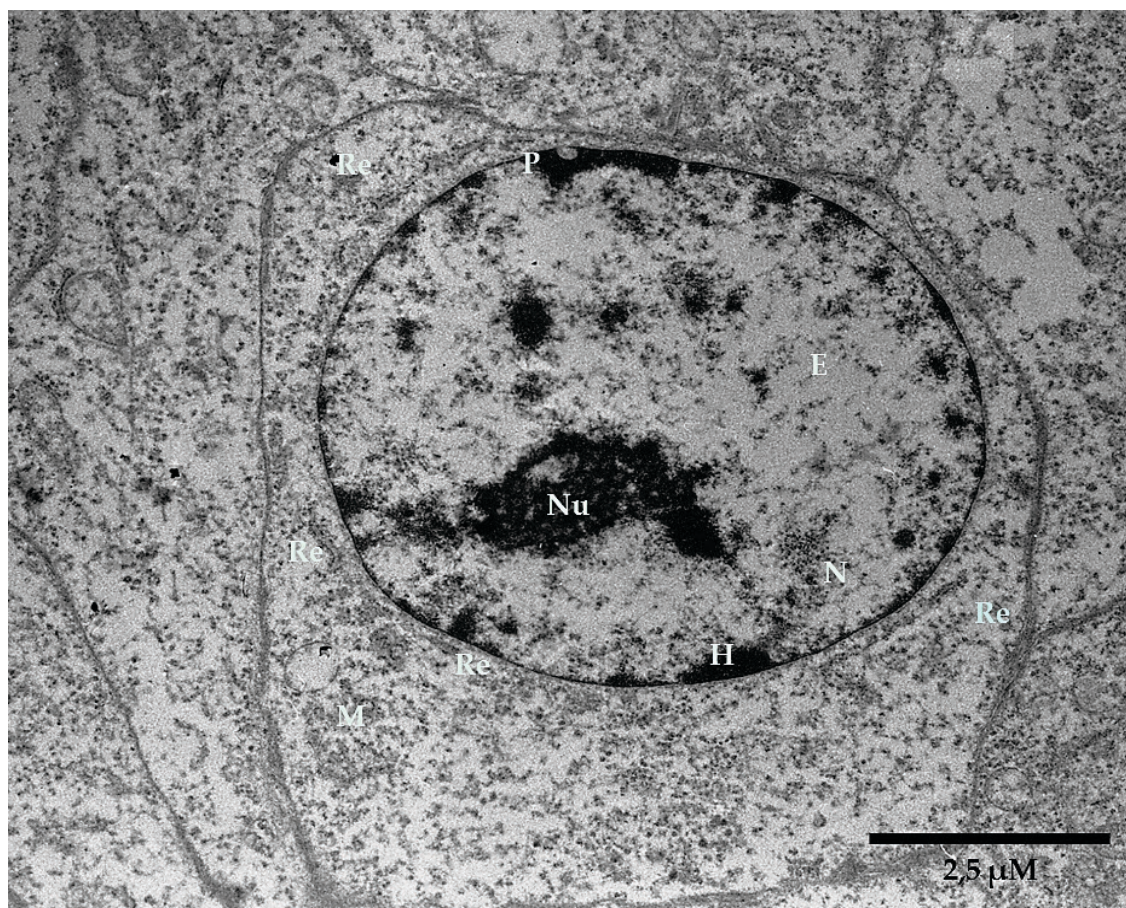


Figura 12 – Particolare di cellula con elevato rapporto nucleo/citoplasma

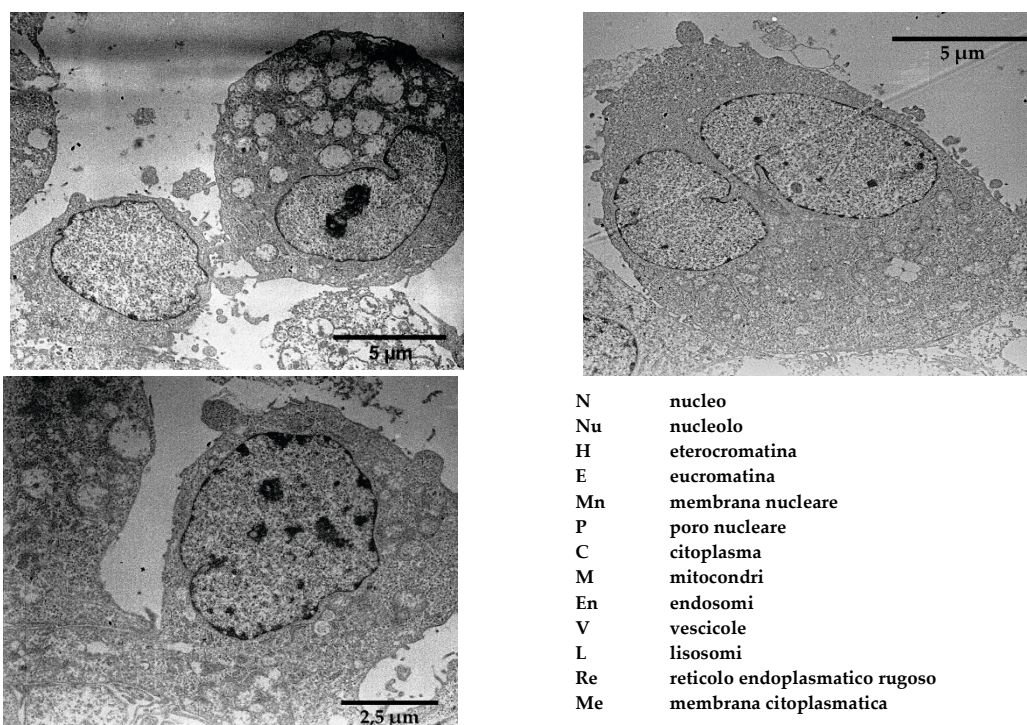


Figura 13 a, b, c – Cellule periferiche con intensa attività metabolica con nuclei caratteristici delle cellule tumorali.

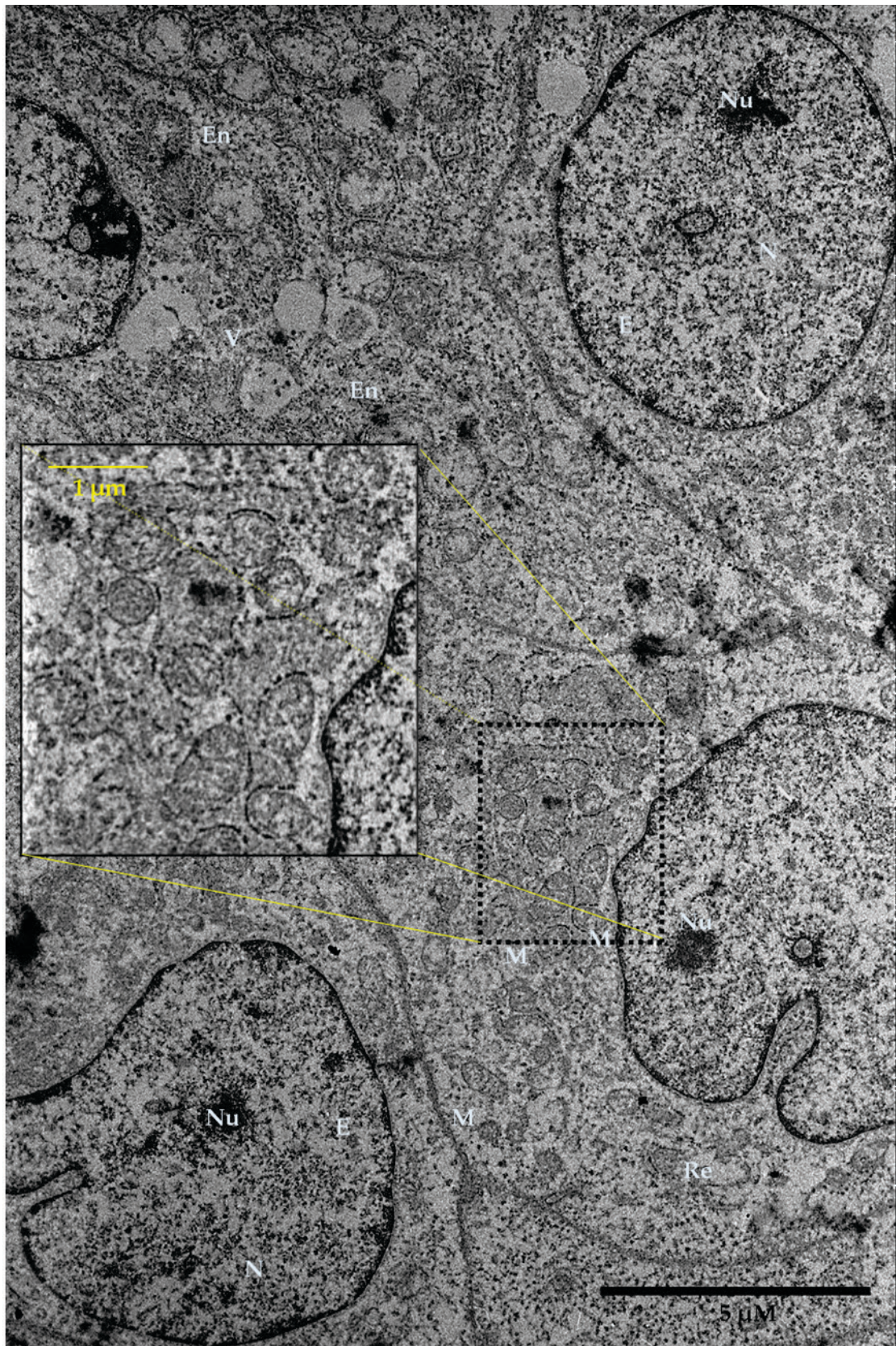


Figura 14 – Zona interna della neurosfera. Presenti numerose cellule, fittamente stipate tra loro, con tipici organuli ed ampia euromatina ad evidenziare una discreta attività cellulare nonostante un micro-ambiente poco permissivo, ipossico e carente di fattori di crescita. Il nucleo è caratteristico delle cellule tumorali, nell'ingrandimento si osserva una porzione citoplasmatica particolarmente ricca in mitocondri.

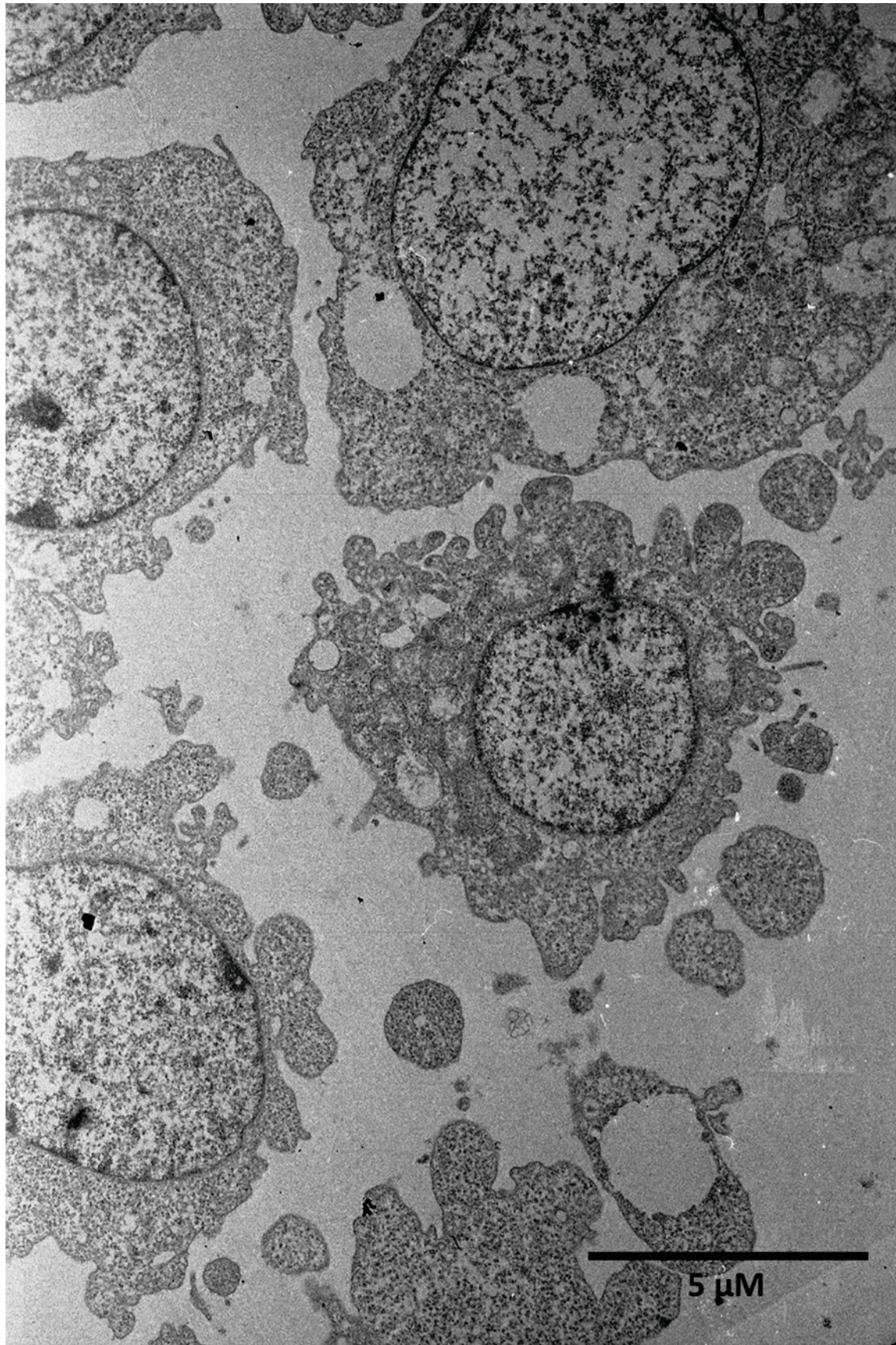


Figura 15 – Zona esterna con cellule maggiormente differenziate, capaci di funzioni endocitotiche e secretorie, (notare i granuli densi arricchiti nel citoplasma. Rapporto elevato nucleo/citoplasma.)

In neurorosfere di linea SK-N-SH, le principali caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali emerse dalle indagini al TEM sono riassumibili dalla dicotomia interno/esterno sfera.

Le cellule periferiche della sfera (Figg. 9 e 13.a,b,c) sono apparse maggiormente marcate a livello citoplasmatico (tetrossido di osmio), rispetto alle cellule interne alla sfera (Fig. 12) ed a quelle che si trovavano già all'esterno della sfera (Fig. 15), con un citoplasma articolato e bruno, segno di una maggior presenza di vescicole lipidiche (endosomi). Inoltre, quasi tutte le cellule possedevano funzionalizzazioni tipiche delle linee di neuroblastoma, fra cui granuli densi e presenza di numerose vescicole endocitotiche/secretorie accompagnate da numerosi mitocondri. Ispezionando le sfere in tutta l'estensione della sezione, sono state osservate, centralmente in maggior misura, vaste aree apoptotiche e necrotiche caratterizzate da fenomeni di blebbing di membrane, raggrinzimenti cellulari, formazione di corpi apoptotici e compattamenti eterocromatinici nucleari (Figg. 11 e 12), prevedibili per via dell'ipossia. Tra queste aree necrotiche, sono apparse delle isole di cellule con elevata vitalità cellulare e nucleo indentato (Fig. 10). In linea di principio, queste cellule potrebbero essere i progenitori neurali (Figg. 12 e 14), dato il loro fenotipo meno differenziato rispetto alle cellule periferiche ed alla apparente mancanza di giunzioni aderenti o strette; inoltre, sono provviste di un ampio compartimento mitocondriale a ridosso del nucleo (Fig. 14 - zoom tratteggiato di giallo) ed i nuclei di queste cellule mostravano quantità di eterocromatina pressoché nulle, ad indicare l'elevata attività trascrizionale. Tutte queste evidenze portano a pensare che le cellule in esame, a differenza delle cellule tumorali comuni, siano capaci di sopravvivere ad un ambiente anossico e di resistere al trattamento farmacologico. In quest'ottica, è stato eseguito un trattamento con TMZ per valutare l'impatto del farmaco sul metabolismo di singole cellule, dissociate da neurosfere e sub-coltivate con dosi crescenti di TMZ.

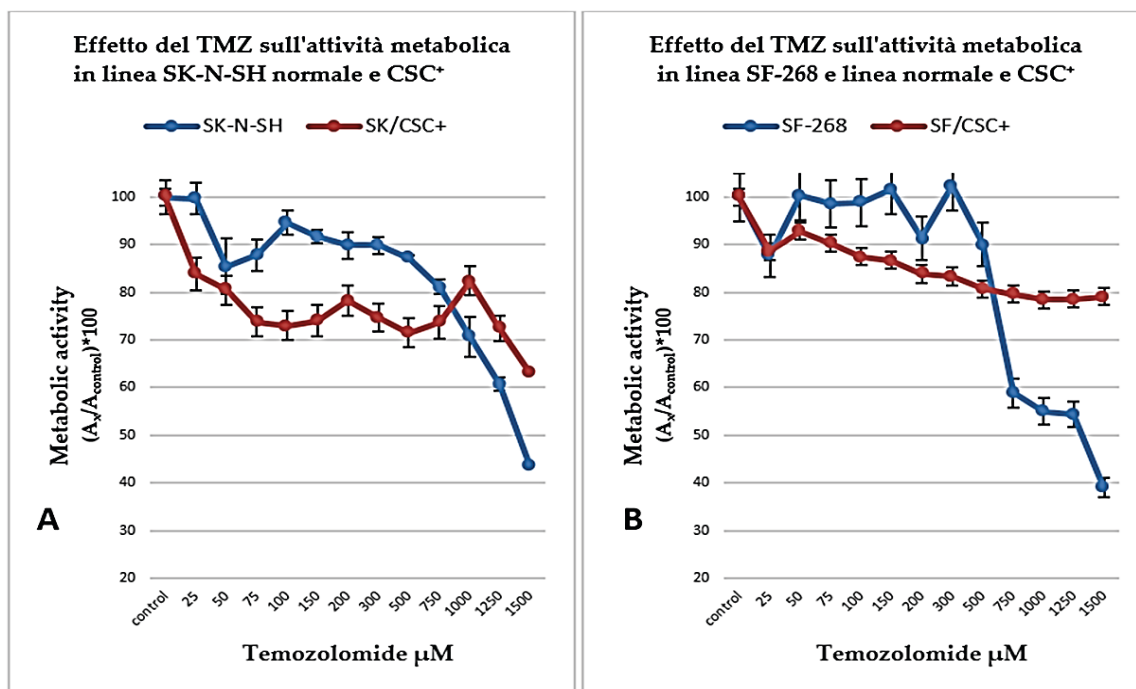


Figura 16 - Valutazione della risposta al farmaco mediante saggi MTT in seguito a trattamento con Temozolomide 0-1500 µM. A: confronto tra linea basale di Neuroblastoma SK-N-SH e sua controparte SK/CSC+, arricchita in CSC dopo 8 giorni di induzione. B: confronto tra linea basale di Glioblastoma multiforme SF-268 e sua controparte SF/CSC+, arricchita in CSC dopo 8 giorni di induzione.

Le curve generate dalle letture delle piastre hanno fornito un quadro interessante, infatti, come è ben visibile dai grafici (Fig. 16), entrambe le CSC-like+ sembrano supportato meno il TMZ a basse concentrazioni. Questo comportamento si è mantenuto stabile sino alla [TM]=500 µm. A dosi maggiori di questo valore, l'attività metabolica delle cellule di linea in terreno DMEM calava drasticamente, mentre le cellule indotte riuscivano a mantenere il loro metabolismo cellulare attivo. Questo dato è in linea con esperimenti condotti da altri autori in altre linee tumorali, in cui sono stati usati gli stessi range di concentrazioni (0-2000 µM) e sono state osservate di farmacoresistenza da parte di fenotipi isolati o indotti.

Analisi dell'espressione genica

Screen del trascrittoma mediante Chip Microarray

L'utilizzo della metodica del Chip Microarray nell'analisi dell'espressione genica consente di eseguire uno screen rapido, e relativamente poco costoso, sull'intero trascrittoma cellulare. L'applicazione dei Affimetryx GeneChip Microarray ha permesso di individuare alcuni geni target arricchiti nelle neurosfere in NSC SFM rispetto alle linee tumorali in coltura DMEM ed associabili alla condizione di staminalità ed alla funzionalità oncogena.

Per il presente lavoro di tesi, gli esperimenti sono stati condotti in duplicato su 2 set di chip differenti e con livelli di threshold elevati in modo da ottenere risultati statisticamente significativi e con stringenze di appaiamento fra cRNA e sequenze bersaglio dei chip tali da discriminare geni realmente espressi differenzialmente, seppur sia presente in questo modo una sotto-stimolazione intrinseca dell'aumento o della diminuzione in termini di *fold change* (FC). Il trascrittoma delle neurosfere flottanti di cellule SF-268 ed SK-N-SH in terreno NSC SFM è stato confrontato con quello delle rispettive linee basali in terreno DMEM.

Nell'analisi dei dati derivanti da un chip microarray, l'aumento o la diminuzione relativa dell'espressione di un gene sono determinati rispettivamente dalla positività o negatività di log FC. Il log FC dei geni riportato nelle tabelle deriva dalla differenza tra il Log (y) delle condizioni sperimentali delle neurosfere in NSC SFM ed il Log (x) delle condizioni basali, ossia linee in coltura con terreno DMEM. Il fattore assoluto FC (*fold change*), privo di segno, indica il numero di volte per cui un gene viene espresso in una condizione rispetto ad un'altra. Ad esempio, entrambe le linee SK-N-SH ed SF-268 hanno avuto Log FC positivi di DCN e LUM in tutti i set di esperimenti ai microarray, risultando in un aumento della loro espressione con un FC di circa 2 nelle sfere rispetto alla condizione basale; diversamente, altri trascritti come SIAE ed HSPB1 hanno avuto un log FC negativo, risultante in una

diminuzione della loro espressione nelle sfere rispetto alla crescita in condizioni di aderenza.

Tabella 2 – Lista di geni differenzialmente espressi tra neurosfere SK-N-SH all’ottavo giorno di induzione in NSC SFM e linea SK-N-SH in DMEM con FBS al 10%. 1nd Chip Microarray.

Gene ID	ACCNUM	Symbol	Name	Log FC	FC	Entrez Gene
rSU1F9I7txuZ3IPQdo	NM_133505	DCN	<i>Decorin</i>	0,75	1,68	1634
Nm.o6Q2TdIPQdo	NM_002345	LUM	<i>Lumican</i>	0,73	1,66	4060
o0Fy0SJJFxFvddf1EXk	NM_001920	DCN	<i>Decorin</i>	0,73	1,65	1634
TSNBBV1W2wGeKDjukI	NM_032870	PNISR	<i>PNN-interacting serine/arginine-rich protein</i>	0,52	1,43	25957

I geni con Log FC negativo e riportati in rosso sono espressi in maggior misura nelle neurosfere, mentre quelli con Log FC positivo e riportati in verde risultano espressi in minor misura.

ID, identità della sequenza nucleotidica. ACCNUM, numero di deposito del gene (codice che viene attribuito ad un gene specifico depositato in banca dati). FC, fold increase (vedi testo). Entrez gene, codice assegnato dal database ENTREZ.

Lo sfondo colorato per DCN e LUM sta ad indicare la ricorrenza dei trascritti in entrambe le linee

Tabella 3 – Lista di geni differenzialmente espressi tra neurosfere SK-N-SH all’ottavo giorno di induzione in NSC SFM e linea SK-N-SH in DMEM con FBS al 10%. 2nd Chip Microarray.

Gene ID	ACCNUM	Symbol	Name	Log FC	FC	Entrez Gene
rSU1F9I7txuZ3IPQdo	NM_133505	DCN	<i>Decorin</i>	0,91	1,88	1634
Nm.o6Q2TdIPQdo	NM_002345	LUM	<i>Lumican</i>	0,90	1,87	4060
o0Fy0SJJFxFvddf1EXk	NM_001920	DCN	<i>Decorin</i>	0,80	1,74	1634
ov7IXo1Bbl4JyDnV6E	NM_002323	TUG1	<i>Taurine upregulated 1 (non-protein coding)</i>	0,58	1,50	55000
N2KVnOX5IqJJ0Go154	XM_001726959	NA	NA	-0,58	1,50	NA
3V0_EI0Xi0X1C_9Tqc	NM_181469	NA	NA	-0,58	1,49	NA
0ApOii0i93iIeijOrs	XM_927579	NA	NA	-0,56	1,47	NA
oIQset0kj4oiRRlrRQ	XR_017241	NA	NA	-0,52	1,43	NA
ce0DjuQBf8evk6A0IA	NM_002345	LUM	<i>Lumican</i>	0,51	1,42	4060
0SSQdTkBTUAhxReWjM	NM_173624	NA	NA	-0,51	1,42	NA
f64rIIP03tdPd5I.ZI	NM_001867	COX7C	<i>Cytochrome c oxidase subunit VIIc</i>	0,51	1,42	1350
oILt.f65f170k9817o	NM_138821	PAM	<i>Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase</i>	0,49	1,41	5066
6aey6nd9dfUW4VQXc	XM_001129232	NA	NA	-0,50	1,41	NA

Tabella 4 – Lista di geni differenzialmente espressi tra neurosfere SF-268 all’ottavo giorno di induzione in NSC SFM e linea SF-268 in DMEM con FBS al 10%. 1nd Chip Microarray.

Gene ID	Gene ACCNUM	Gene Symbol	Gene Name	Log FC	FC	Entrez Gene
rSU1F9I7txuZ3IPQdo	NM_133505	DCN	<i>Decorin</i>	0,79	1,83	1634
Nm.o6Q2TdIPQdo	NM_002345	LUM	<i>Lumican</i>	0,77	1,71	4060
o0Fy0SJJFxFvddf1EXk	NM_001920	DCN	<i>Decorin</i>	0,74	1,66	1634
H6qVIJ5ANY4h5ZQsCU	NM_001540	HSPB1	<i>Heat shock 27kDa protein 1</i>	- 0,50	1,42	3315
TSNBBV1W2wGeKDjukI	NM_032870	PNISR	<i>PNN-interacting serine/arginine-rich protein</i>	0,46	1,38	25957
QsuV5SVdX0_f08SFKs	NM_170601	SIAE	<i>Sialic acid acetyltransferase</i>	- 0,46	1,37	54414
iVfdV5HsA7qPOrRkaa	NM_003299	HSP90B1	<i>Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1</i>	0,45	1,37	7184
oSTy5PqCjfx5.ufpO0	NM_007166	PICALM	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>	0,45	1,37	8301
uL6367TOjSKRC5Ip7o	NM_002064	GLRX	<i>Glutaredoxin (thioltransferase)</i>	0,45	1,36	2745
fIF.5cUMfrsCCDV01U	NM_014886	NSA2	<i>NSA2 ribosome biogenesis homolog (S.cerevisiae)</i>	0,44	1,36	10412
ZeEuC6evE1pCauH1NI	NM_031311	CPVL	<i>Carboxypeptidase, vitellogenin-like</i>	0,44	1,35	54504

Tabella 5 – Lista di geni differenzialmente espressi tra neurosfere SF-268 all’ottavo giorno di induzione in NSC SFM e linea SF-268 in DMEM con FBS al 10%. 2st Chip Microarray.

Gene ID	Gene ACCNUM	Gene Symbol	Gene Name	Log FC	FC	Entrez Gene
6SsepaCuuvs27gpNA	XM_939484	NA	NA	0,85	1,80	NA
rSU1F9I7txuZ3IPQdo	NM_133505	DCN	<i>Decorin</i>	0,83	1,78	1634
Nm.o6Q2TdIPQdo	NM_002345	LUM	<i>Lumican</i>	0,80	1,75	4060
o0Fy0SJJFxFvddf1EXk	NM_001920	DCN	<i>Decorin</i>	0,74	1,67	1634
f64rIIP03tdPd5L.ZI	NM_001867	COX7C	<i>Cytochrome c oxidase subunit VIIc</i>	0,49	1,40	1350
3V0_EI0Xi0X1C_9Tqc	NM_181469	NA	NA	- 0,48	1,4	NA
QZJ1UNEckE.QufijTk	NM_003118	SPARC	<i>Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)</i>	0,47	1,38	6678
rSm3mA0zp7JPbnNXqo	NM_004374	COX6C	<i>Cytochrome c oxidase subunit VIC</i>	0,45	1,37	1345
TSNBBV1W2wGeKDjukI	NM_032870	PNISR	<i>PNN-interacting serine/arginine-rich protein</i>	0,45	1,37	25957
ER1CPOI2pC5764iHeg	NM_000521	HEXB	<i>Hexosaminidase B (beta polypeptide)</i>	0,45	1,36	3074
ov7IXo1BbI4JyDnV6E	NM_002323	TUG1	<i>Taurine upregulated 1 (non-protein coding)</i>	0,44	1,37	55000
NJ1q6evdLr7dO3f.e0	NM_006432	NPC2	<i>Niemann-Pick disease, type C2</i>	0,44	1,35	10577
WunOQSd0XGYt8f4vLk	NM_002211	ITGB1	<i>Integrin, beta 1 (fibronectin receptor CD29)</i>	0,43	1,35	3688

e

I pattern di espressione in linea SK-N-SH (*Tabb 2 e 3*) hanno mostrato essenzialmente un aumento delle varianti A1 (NM_001920; FC 1,68 e 1,88) e C (NM_133505; FC 1,65 e 1,74) di trascritti di DCN e per il trascritto di LUM (NM_002345; FC 1,66 e 1,87/1,42) LUM nelle sfere in entrambi i chip, Tra gli altri geni sono stati elencati i trascritti di COX7C, PAM, PNISR e TUG1.

Per quanto concerne il set di geni differenzialmente espressi nelle neurosfere SF-268 rispetto alle colture standard (*Tabb 4 e 5*), emerge ancora un volta il ruolo dell'eterogeneità cellulare nei dati sperimentali, eccetto per le stesse varianti rinvenute nella linea di NBL, ossia varianti A1 (NM_001920; FC 1,67 ed 1,66) e C (NM_133505; FC tra 1,78 ed 1,83) del trascritto di DCN e trascritto unico di LUM (NM_002345; FC tra 1,75 ed 1,71); DCN e LUM codificano entrambi per prodotti proteici appartenenti alla famiglia dei piccoli proteoglicani ricchi in leucine (SLRP). Questi due geni si distinguono dagli altri in quanto sono gli unici ad essere espressi differenzialmente in entrambe le sfere nei due set di esperimenti. Inoltre, sono gli unici trascritti ad avere un FC maggiore di 1,5.

Da evidenziare nei dati dei microarray, la modulazione di geni legati alla degradazione di gangliosidi GM2 ed altre molecole con terminali N-acetil esomminici (HEXB), in quanto alcuni autori hanno evidenziato che in modelli animali di malattie neurodegenerative in cui il gene hexb era mutato, trapianto e stimolazione di cellule staminali neurali ha portato ad una maggior produzione di HEXB cerebrale, con conseguente riduzione di gangliosidi GD2 e miglioramento del quadro clinico dell'animale [129] e che quindi, verosimilmente, potrebbe la trascrizione di HEXB potrebbe essere favorita da fattori comuni alla staminalità.

TUG1 (taurine upregulated gene 1), un altro trascritto risultato maggiormente espresso nelle neurosfere di entrambe le linee in NSC SFM, rispetto alle condizioni basali di crescita in DMEM (*Figg. 2 e 4*), richiama necessariamente il concetto appena esposto riguardo l'interazione con fattori di staminalità ed oncogenicità. Infatti, TUG1 è un trascritto non codificante (lncRNA) di grandi dimensioni, espresso e modulato durante lo sviluppo neuronale [130], in particolare durante la formazione dei fotorecettori della

retina in risposta alla taurina [131]. Una sua aberrante espressione è stata rinvenuta in pazienti affetti da *Corea di Huntington* ed in alcune neoplasie, quali carcinoma gastrico e cancro alla vescica [132, 133]. Inoltre, la sua presenza correla con lo stadio ed il grado di malignità dei tumori e cellule di osteosarcoma TUG1^{KO} si rivelano meno capaci di proliferare e più inclini a fenomeni apoptotici [134].

Il gene SPARC codifica per un proteoglicano della ECM ricco in cisteine. Similmente a DCN e LUM, anche SPARC ha un ruolo attivo nella riparazione al danno tissutale ed è particolarmente richiesto durante la calcificazione del collagene nel tessuto osseo [135]. Oltre a svolgere questo ruolo fisiologico, SPARC è coinvolto nella sintesi e regolazione del collagene tipo I e della ECM ed è in grado di influenzare il micro-ambiente e promuovere cambiamenti nella morfologia cellulare attraverso un vasto network di interazioni con cationi divalenti (calcio, rame), vari tipi di collagene, citochine, albumina, trombospondina, PDGF, membrane cellulari ed altre molecole della ECM, [136, 137].

La capacità di SPARC di modulare la morfologia cellulare in relazione alla ECM conferisce alla proteina un duplice ruolo nel micro-ambiente tumorale, essendo in grado di inibire la proliferazione di astrociti [138] e linee di neuroblastoma [139] da una parte, e favorire migrazione [140] e promuovere angiogenesi ed episodi metastatici dall'altra [141].

Recentemente, alcuni autori hanno inserito SPARC all'interno di un gruppo di geni chiave nell'invasione cellulare in seguito ad un brillante studio sperimentale in cui è stato ottenuto un fenotipo cellulare migratorio ed invasivo da NSC corticali non tumorali, trattate con FGF e BMP4 [142]. È interessante notare che l'induzione dell'invasività in cellule non tumorali ha permesso di identificare un set significativo di geni, attivati da FGF e coinvolti nello *switch* fenotipico, e che questi geni (SPARC, Ngfr, Snail1, ecc) risultano maggiormente espressi *in vivo*, durante od in seguito alla transizione EMT nella cresta neurale, ed in campioni di pazienti affetti da GBM rispetto a biopsie sane. Questa scoperta evidenzia ancora una volta l'esistenza di un'intima connessione tra le cellule staminali e le cellule tumorali circa i

meccanismi molecolari che sottendono i fenomeni di migrazione, invasione ed angiogenesi.

Tra gli altri geni espressi differenzialmente per la loro risposta ai cambiamenti ambientali, compaiono due componenti delle *heat shock protein* HSPb1 e HSP90B1. Quest'ultima è uno *chaperons* molecolare e sembra essere richiesta per il corretto folding dei recettori toll-like, sui quali agisce la DCN. Inoltre appaiono modulati i trascritti di PNISR in entrambe le sfere (fattore di splicing della famiglia delle SR protein), PICALM, proteina che regola l'assemblaggio del *triskelion* di Clatrina nelle aree in cui andranno a formarsi le fossette rivestite endocitotiche (vedi TEM); l'enzima citoplasmatico GLRX della famiglia delle *Glutaredoxine*, che agisce come antiossidante catalizzando la riduzione dei ponti disolfuro tra glutatione e proteine, NSA2, che promuove il corretto funzionamento e la biogenesi delle sub-unità 60S ribosomiali e partecipa alla regolazione del ciclo cellulare e della proliferazione ed infine CPVL coinvolto nella digestione lisosomiale delle sostanze fagocitate.

Aumento tempo-dipendente di DCN e LUM in sfere 3-D mediante Real Time qRT-PCR

Nelle determinazioni quantitative mediante qRT-PCR, i geni target sono stati DCN e LUM in esperimenti a 4, 8 e 12 gg di induzione in neurosfere mediante terreno NSC SFM; come calibratore è stato utilizzato, analogamente alle analisi con i chip microarray, l'espressione genica della condizione basale in terreno DMEM, mentre il controllo endogeno è stato eseguito su 2 HKG (GAPDH e β -Actina). Dall'analisi dei singoli Ct è emersa come prima cosa una aberrante modulazione di GAPDH nelle sfere di entrambe le linee in relazione al tempo di induzione. I Ct dei trascritti di GAPDH delle linee basali avevano un valore di circa 19 mentre nelle linee indotte si arrivava ad un Ct di 23 all'ottavo giorno di induzione delle sfere. Questo dato pone in luce l'effettiva modulazione dell'attività metabolica delle neurosfere, e, parzialmente,

spiegherebbe il *breakdown* metabolico che subiscono le cellule indotte in seguito a dissociazione delle neurosfere, osservato nei saggi MTT.

Per prima cosa sono stati graficati i valori di ($2^{-\Delta Ct}$) con lo scopo di osservare le differenze fra i Ct dei geni target ed i Ct dei geni HKG in ogni condizione sperimentale (Fig. 17) che hanno permesso di “validare” il dato derivante dall’analisi ai microarray. Infatti è emerso che le linee basali esprimono bassi livelli di DCN e LUM, meno che la linea di GBM che riporta alti livelli di LUM (maggiori di GAPDH e β -Actina) anche in terreno DMEM.

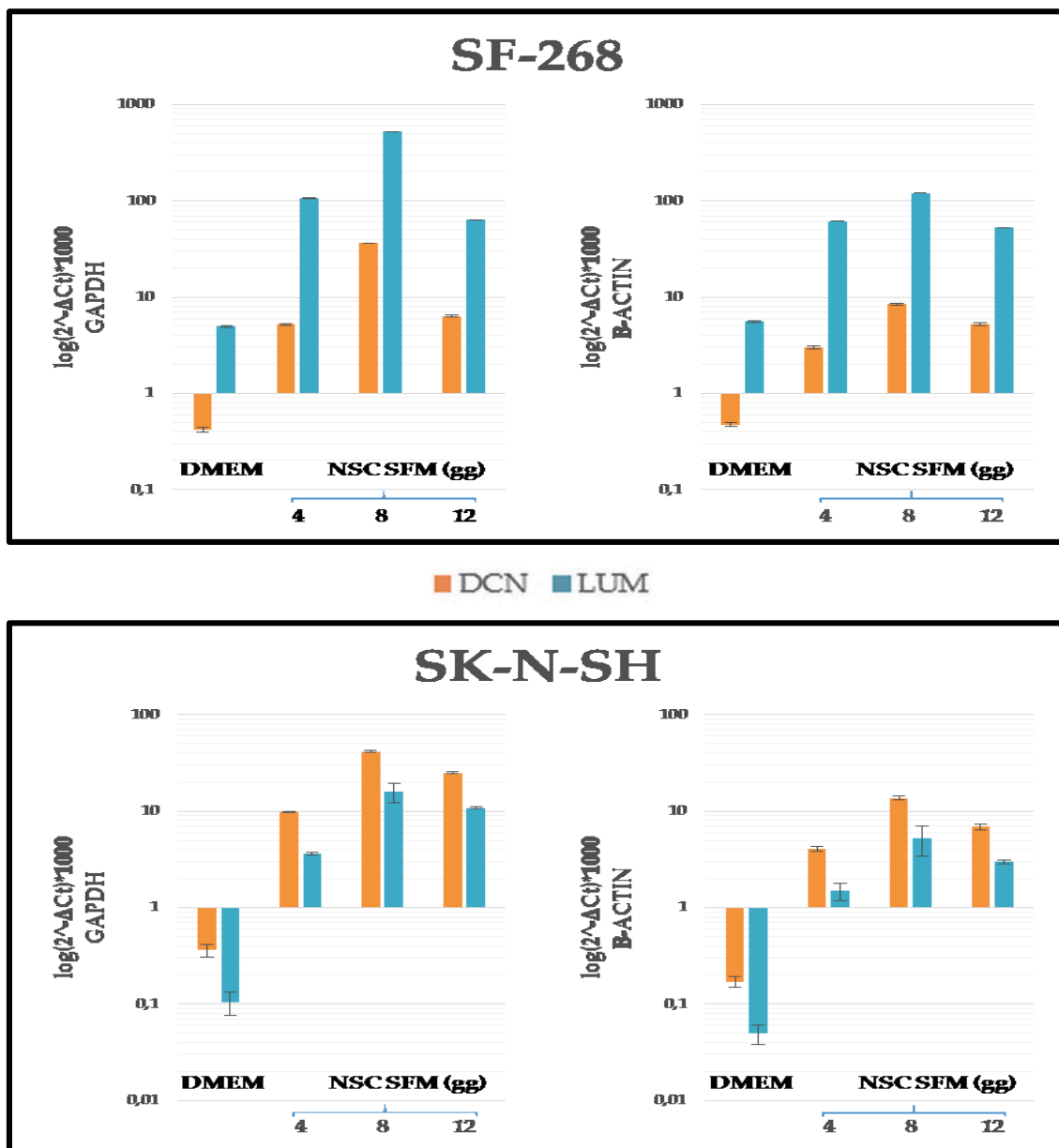


Figura 17 – Espressione relativa di decorina e lumicano in relazione a gapdh (a sinistra) e β -actina (a destra) nelle sfere SF-268 (in alto) e SK-N-SH a 4, 8 e 12 giorni di induzione in NSC SFM. Dati espressi come $2^{-\Delta Ct} \cdot 1000$ rispetto ai geni HKG.

Confrontando i grafici dei due HKG si osserva una proporzionalità fra le due normalizzazioni. Il confronto delle variazioni di Ct dei geni HKG ha permesso di stabilire che l'anomalia stava nell'espressione di GAPDH, per cui i dati normalizzati sulla β -Actina sono maggiormente descrittivi del dato oggettivo. Nonostante questo, è stato registrato un leggero calo anche nei Ct della β -Actina, proporzionale ai tempi di induzione. Questo permette di spiegare la discrepanza osservata con i valori di FC del microarray.

Con questo metodo, oltre a dimostrare un'ingente attivazione di entrambi i geni in entrambe le linee, è stato possibile riportare differenze cellulo-specifiche nelle condizioni basali e nelle sfere, in quanto, ha permesso di stabilire che, di base, la linea di GBM esprime meno DCN rispetto ai geni HKG e LUM, mentre le linee di NBL la esprimono maggiormente.

In un secondo momento, per avere un dato standardizzato che potesse essere confrontabile fra le varie condizioni, sono stati sviluppati e graficati i valori di FC mediante il log di $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ calcolato fra i ΔCt delle condizioni indotte ed i ΔCt delle linee basali (vedi Materiali e metodi).

Il grafico in scala logaritmica del valore $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ha permesso di quantificare in termini di FC la modulazione dell'espressione genica osservata in precedenza (Fig. 18). Anche con questo metodo è stato possibile osservare i valori aberranti delle espressioni normalizzate sulla GAPDH. Sfere di GBM a 4, 8 e 12 gg di induzione esprimono livelli di DCN e LUM con FC=20 nel punto massimo di espressione (8 gg, DCN=17,88; LUM=21,78).

Nella linea di NBL l'aumento dell'espressione di proteine SLRP è avvenuto in maniera proporzionale alla linea di GBM ma con FC nettamente superiori (8 giorni, DCN=80 e LUM=150). Presi insieme, questi risultati mostrano una correlazione fra gli aumenti dell'espressione di DCN e LUM in entrambi i modelli di GBM e NBL in vitro e che il LUM viene maggiormente modulato

durante l'induzione in terreno NSC SFM rispetto alla DCN, nonostante risulti chiara una correlazione fra i due geni.

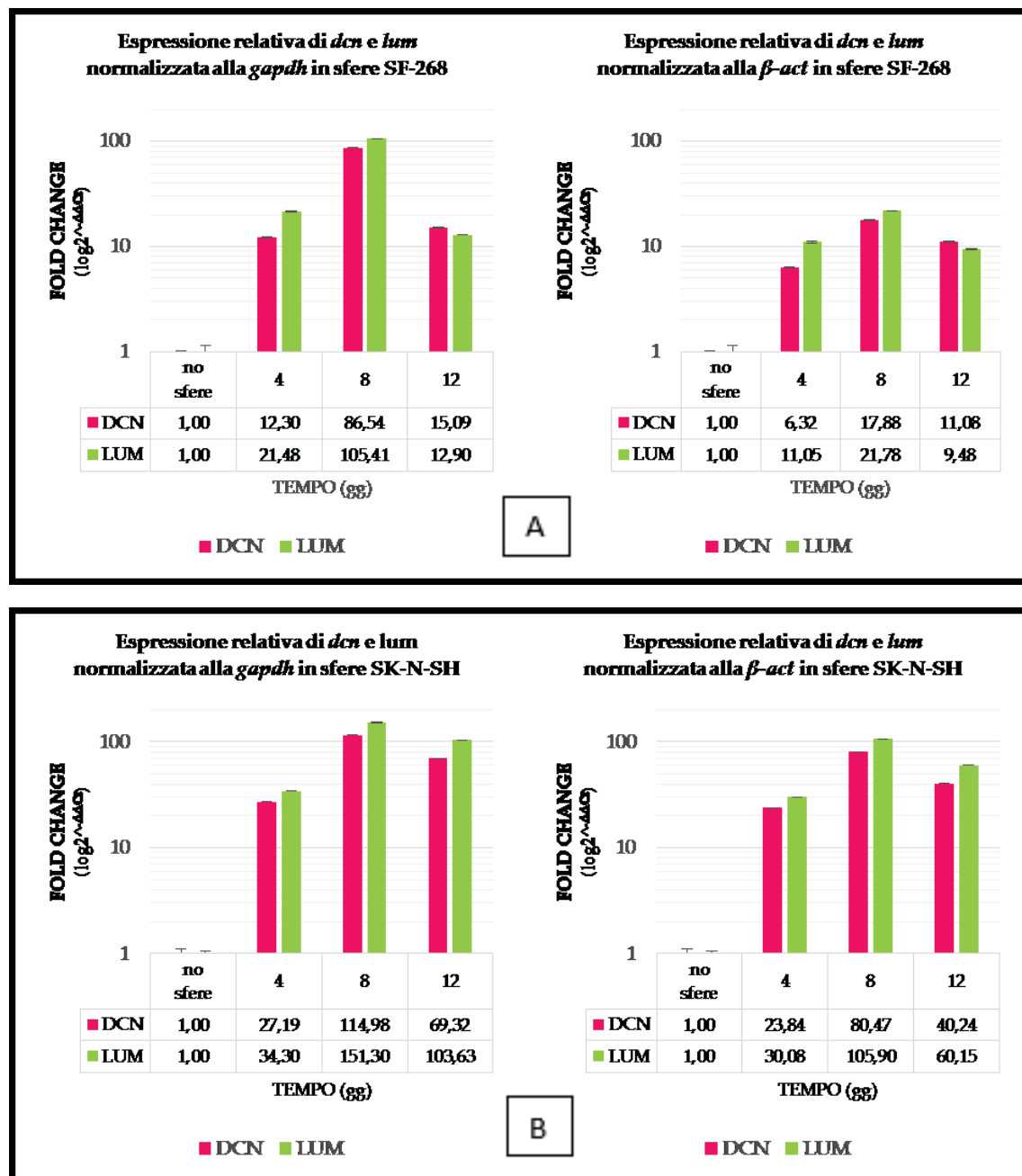


Figura 18 – qRT-PCR mediante chimica SYBR green nella valutazione dell'espressione relativa di decorina e lumicano nelle sfere di Glioblastoma multiforme e Neuroblastoma derivanti dalle linea SF-268 (A) e SK-N-SH (B) a 4, 8 e 12 giorni di induzione rispetto al relativo controllo in coltura DMEM. Normalizzazioni e barre di errori su 2 geni *housekeeping* del metabolismo cellulare (GAPDH a sx) e della funzione strutturale del citoscheletro (B-Atina a dx). Dati espressi in *fold increase* mediante sviluppo dell'algoritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Isoforme differenti di LUM in relazione al tempo di induzione

Avendo notato che il lumicano veniva maggiormente modulato in entrambe le linee, è stato allestito un saggio di immunoblot che ha mostrato risultati parzialmente paragonabili ai dati di qRT-PCR. Entrambe le linee hanno mostrato un aumento dei prodotti proteici di LUM in relazione al tempo di induzione, riconoscibili dai pesi molecolari che assumono in caso di funzionalizzazioni specifiche (Fig. 19, a dx). Inoltre, un dato interessante da prendere in considerazione in successive caratterizzazioni e studi funzionali è quello relativo all'espressione di una forma di lumicano di 70kDa, in relazione al tempo di induzione, con aumento massimo e bande ben distinguibili ad 8 gg di induzione in NSC SFM (Fig. 19). Questa forma è stata associata in letteratura a promozione della proliferazione cellulare.

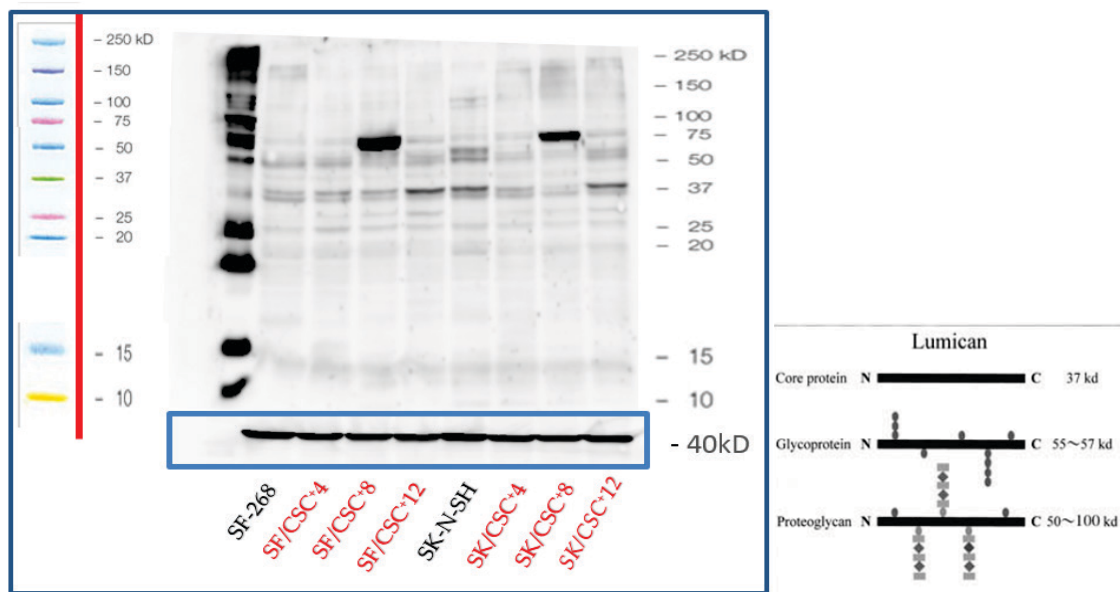


Figura 19 – (Sx) Immunoblot degli estratti totali e rilevazione chemio-luminescente mediante anticorpo in rabbit anti-lumicano (H-90) nelle linee basali in condizioni di aderenza (in nero) e le sfere a 4, 8 e 12 giorni di induzione (in rosso). Normalizzazione sulla b-actina. Le bande di circa 40, 60 e 70kDa corrispondono a forme differenti di lumicano (catene laterali e funzionalizzazioni, core 37kDa, glicoproteina 50-60kDa, proteoglicano ≥ 70 kD). (Dx) forme rappresentative di isoforme di Lumicano di vari PM.

Nelle acquisizioni dell'espressione della DCN, è stato possibile osservare una modulazione del core proteico della DCN di 37kDa in sfere tardive ad 8 e 12 gg di induzione (Fig. 20).

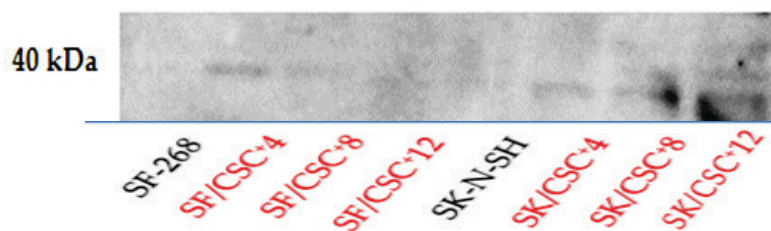


Figura 20 – Immunoblot degli estratti totali e rilevazione chemio-luminescente mediante anticorpo in mouse anti-decorin nelle linee basali in condizioni di aderenza (in nero) e le sfere a 4, 8 e 12 giorni di induzione (in rosso). Normalizzazione sulla b-actina. Le banda riportata corrisponde al core proteico di circa 37 kDa. Da notare l'attivazione nel giorno 4 nella linea di NBL e di un aumento di DCN nella linea di NBL nelle fasi tardive dell'induzione

V. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Una visione unificata sullo stato dell'arte inerente i tratti caratteristici delle cellule tumorali pone in rilievo nuovi aspetti peculiari che discriminano le forme aggressive dai tumori benigni. Nel corso degli ultimi 10 anni sono emerse nuove evidenze riguardo la relazione tra oncogenicità e staminalità, e che la formazione di metastasi sembra essere il tratto maggiormente descrittivo dei tumori aggressivi e maligni. I tratti caratteristici dei tumori, descritti da Hanahan e Weinberg in un articolo del 2000 [43], che rappresenta una pietra miliare sulla descrizione e sintesi dei tratti caratteristici delle neoplasie, sono stati rivisitati dagli stessi autori [44] e da altri [45] alla luce di un confronto maggiormente discriminante fra tra il cancro e le forme benigne di tumore. In questo contesto, la composizione del micro-ambiente tumorale, la capacità di riprogrammare il metabolismo cellulare e l'evasione del sistema immunitario sono stati aggiunti ai concetti base descritti in precedenza, quali intensa attività proliferativa, evasione apoptotica, resistenza a morte cellulare, induzione di angiogenesi, attivazione di programmi di replicazione per tempi indefiniti, e formazione di metastasi.

La formazione di metastasi *in vivo* può avvenire esclusivamente se le cellule tumorali acquisiscono nuove capacità migratorie ed invasive (*Fig. 21*).

Biologicamente, questo processo risulta sostenuto dalla transizione EMT e dal suo processo reversibile MET, in risposta alla composizione del micro-ambiente tumorale. La transizione verso i fenotipi staminali promuove la de-differenziazione delle cellule tumorali e la disseminazione all'interno del tumore primario (distacco delle cellule epiteliali dalla lamina basale), mentre la transizione MET favorisce l'ancoraggio e la proliferazione delle cellule tumorali in altri organi target, con conseguente formazione di metastasi [34, 35] mediante successivi fenomeni di proliferazione e differenziazione cellulare.

Fenomeni di senescenza, apoptosi ed efficacia dei farmaci nei tumori risultano sensibilmente inibiti dalla transizione EMT, nella quale vengono attivati una serie di geni da parte di fattori extracellulari che promuovono invasione ed evasione dalla sorveglianza immunitaria [37, 38].

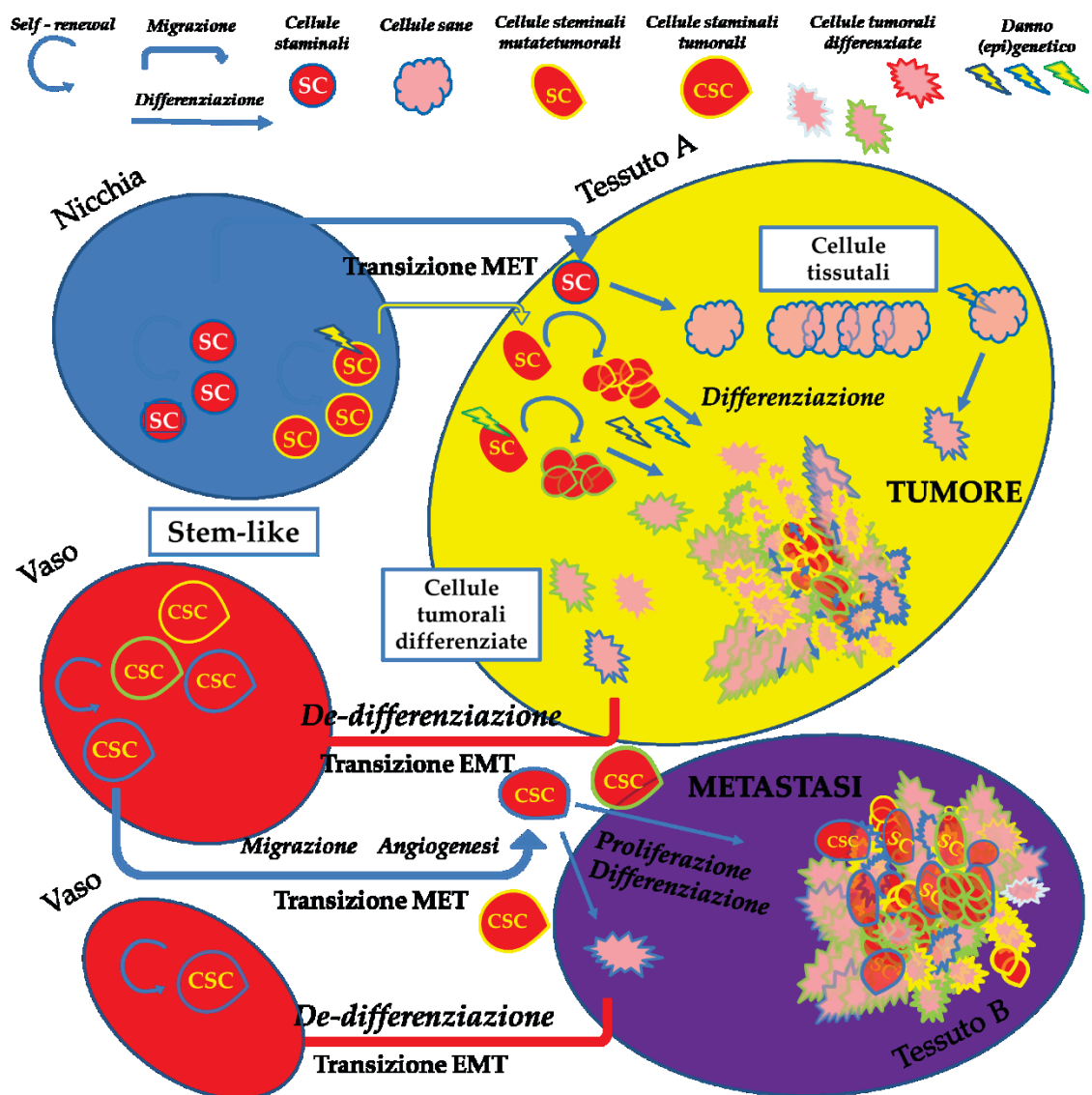


Figura 21 – Interpretazione e mappa concettuale del Cancro. Ruolo del micro-ambiente (macroaree ovoidali), delle CSC e delle transizioni EMT e MET nei fenomeni metastatici.

Le cellule tumorali che vanno incontro ad EMT riescono a migrare ed invadere i tessuti circostanti acquisendo proprietà simili alle cellule staminali, come mostrano gli aumenti dell'espressione di marker di staminalità in seguito alla transizione [39]. In questo quadro, la situazione si complica ulteriormente in quanto i nuovi fenotipi cellulari, oltre ad essere maggiormente migratori ed invasivi, risultano avere anche un potenziale oncogenico di gran lunga maggiore per via dei tratti staminali acquisiti, e conseguente resistenza ai farmaci [40].

Come riportato in precedenza, il programma EMT è un notevole esempio di transizione fenotipica in cui è coinvolta la plasticità cellulare a carattere staminale, fondamentale per la progressione del cancro.

La crescita indipendente dall'ancoraggio cellulare e l'attivazione di meccanismi molecolari staminali-simili che regolano i fenomeni di migrazione ed invasione sembrano essere dipendenti dal micro-ambiente e dal grado di eterogeneità tumorale; a conferma di questo, sono presenti in letteratura numerosi studi sul ruolo della ECM nella regolazione delle funzionalità delle CSC, in cui vengono evidenziati il significato biologico e clinico del micro-ambiente tumorale e dell'eterogeneità cellulare in termini di insorgenza, ricorrenza e resistenza dei tumori alle terapie [59, 143-145].

In questa tesi è stato riportato un modello tumorale *in vitro* 3-D di cancro, descritto da numerosi autori come altamente rappresentativo della patologia *in vivo* ed adottato come *gold standard* nell'arricchimento di CSC da espianti primari di pazienti oncologici e linee tumorali [146].

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di applicare il modello 3-D in linee umane stabilizzate di GBM e NBL con lo scopo di mimare *in vitro* l'induzione in fenotipi staminali che avviene durante la transizione EMT e caratterizzare, a livello ultra-strutturale e molecolare, l'effetto del terreno NSC SFM sulle linee.

L'induzione di neurosfere da linee SF-268 e SK-N-SH in terreno NSC SFM ha mostrato (per entrambe le linee) eterogeneità nella dimensione, morfologia e capacità proliferativa dei modelli sferoidali 3-D e delle cellule isolate dalle sfere. Entrambe le linee sono state in grado di generare neurosfere composte al loro interno da cellule progenitrici staminali-simili capaci di rigenerare neurosfere in saggi secondari in soft agar e resistenti ad alte concentrazioni di TMZ. Inoltre, nelle colture in sospensione, veniva generato in seguito ad ogni passaggio sub-culturale, un sottogruppo di cellule differenziate che rimaneva adeso anche in terreno senza siero, indice di differenziazione cellulare post-induzione e non di persistenza delle linee in uno stato differenziato dal principio. La generazione di piccole sfere in agar limitrofe alla sfera madre, contestualmente alla formazione, in seguito ad ogni passaggio in sospensione, di cellule non capaci di generare sfere (maggiormente differenziate), hanno conferito alle cellule indotte proprietà staminali simili, quali proliferazione, self-renewal, differenziazione e

migrazione, tutti tratti caratteristici dei tumori maligni. Questo dato andrebbe a favore di un transizione reversibile tra fenotipi staminali e non, come accade nella transizione EMT.

L'aumento delle dimensioni durante le induzioni generava in maniera proporzionale un ambiente interno alle sfere sempre più ipossico e povero di fattori di crescita. Infatti, a partire dal quarto giorno di induzione, alcune sfere derivate dalla linea di GBM hanno iniziato a mostrare un core scuro ben visibile al centro della struttura tridimensionale, riconducibile alla presenza di fenomeni apoptotici e necrotici [128]. La formula del terreno NSC SFM ha supportato un effettivo arricchimento in cellule progenitrici con ampio potere di differenziazione. Inoltre, la coltura delle linee, mediante terreno selettivo in soft agar, ha permesso di ottenere sfere arricchite in cellule progenitrici capaci di proliferare e migrare in risposta alla specificità del siero ed all'ambiente ipossico interno alle sfere. Inoltre, esperimenti con saggi MTT hanno evidenziato che cellule di sfere a 8 giorni di induzione sono apparse maggiormente chemio-resistenti rispetto alle linee in colture routinarie in DMEM. Questo dato è di estrema importanza se si tiene conto dell'enorme mole di lavoro e di soldi investiti fino ad oggi a livello mondiale nella ricerca e sviluppo di molecole che riescono ad inibire la crescita cellulare *in vitro* in condizioni di crescita *routinarie*, ma che in seguito si rivelano inadeguate nel bersagliare le CSC *in vitro* ed *in vivo* e nei trials clinici avanzati sui pazienti.

I dati emersi dalla microscopia elettronica su sfere da linea NBL in sospensione, contestualmente ai saggi di induzione in terreno soft agar, hanno evidenziato una differenza morfologica e funzionale fra l'interno e la periferia di sfere ad 8 giorni di induzione. In particolare, all'interno delle sfere sono state osservate, in un ambiente interno necrotico ed apoptotico, una serie di cellule prive di segni di sofferenza, caratterizzate da elevata vitalità cellulare e tratti nucleari di cancerogenicità, quali morfologia indentata, scarsa eterocromatina e rapporto nucleo/citoplasma elevato. Inoltre, queste cellule erano in grado di duplicare in un ambiente ipossico, in accordo con gli episodi di mitosi rilevati al TEM.

I risultati della risposta ai trattamenti con TMZ hanno fornito ulteriori conferme in merito all'effettivo arricchimento in cellule progenitrici con proprietà staminali. Infatti, entrambe le linee hanno mostrato fenomeni di farmaco-resistenza in seguito a trattamento con dosi elevate di TMZ. Questo dato è in linea con le recenti scoperte inerenti il ruolo delle CSC e dei progenitori neurali nella resistenza ai trattamenti farmacologici.

La caratterizzazione molecolare mediante microarray di linee indotte ad 8 giorni ha permesso di identificare un set di geni promossi nelle linee di GBM e NBL dal terreno NSC SFM, maggiormente espressi nelle cellule indotte rispetto alle linee in condizioni di aderenza. I dati dei *microarray* differenziali hanno mostrato una modulazione di geni che codificano per proteine secrete nella ECM (DCN, LUM e SPARC), di fattori legati alle funzionalità cellulari (COX7c e COX6c, PICALM, PNISR) e di trascritti non codificanti e proteine coinvolte nello sviluppo (TUG1, HEXB). Il dato maggiormente conservato fra le induzioni di entrambe le linee è stato l'aumento dell'espressione genica di DCN e LUM, proteoglicani della ECM, appartenenti alla famiglia delle SLRP, e PNISR, fattore di splicing della famiglia SR.

L'analisi in Real Time qRT-PCR dei geni di DCN e LUM normalizzati su GAPDH e β -Actina ha permesso di ottenere una serie di risultati con un significato biologico di estrema importanza. Per prima cosa, è interessante notare la differenza nei trend di espressione tra i due geni *housekeeping* fra le linee basali e le linee indotte. Se da una parte la β -Actina è rimasta costante fra le varie condizioni, i dati dei Ct della GAPDH suggeriscono una modulazione negativa dell'attività metabolica da parte delle sfere; infatti i valori di FC di DCN e LUM normalizzati sulla GAPDH sono risultati proporzionalmente maggiori rispetto alla normalizzazione sulla β -Actina. Questo risultato è da prendere in considerazione, in quanto una delle caratteristiche principali delle cellule dei tumori maligni è quella di modulare l'attività metabolica in risposta al micro-ambiente. Inoltre spiegherebbe parzialmente il *breakdown* metabolico iniziale osservato nei saggi di MTT con TMZ.

La famiglia dei proteoglicani SLRPs, piccoli proteoglicani ricchi in leucina, è composta da 17 proteine, attualmente suddivise in 5 classi in relazione a

composizione strutturale (presenza di sequenze ripetute ricche in leucina LRR e cisteine all’N-terminale) e locazione cromosomica. Queste proteine vengono normalmente prodotte dai fibroblasti e depositate nella ECM durante lo sviluppo fetale. Gli SLRPs sono formati principalmente da due componenti strutturali: 1) il core proteico di 40/50 kDa normalmente ricco in leucine e 2) le funzionalizzazioni laterali di catene di glicosaminoglicani, comprendenti catene glucidiche con cheratan-, condroitin-, eparan- o dermatan-solfati. Il core proteico presenta in condizioni fisiologiche la sequenza consenso **LXX-LXLXXNXL** dove: **X** è un qualsiasi aminoacido, **L** rappresenta la leucina, Iso-leucina o valina ed **N** asparagina, cisteina o treonina (Fig.22). Queste ripetizioni ricche in leucina (LRRs) sono normalmente fiancheggiate da sequenze con 4 cisteine all’N-terminale e 2 cisteine al C-terminale della proteina.

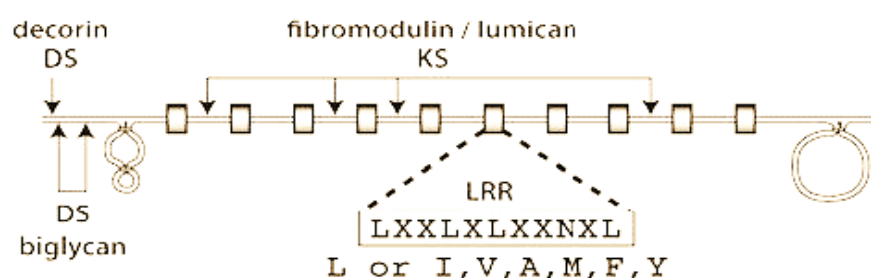


Figura 22 – Struttura dei proteoglicani SRLP. DS, dermatan-solfato nella regione N-terminale (a sx) della decorina; KS, cheratan-solfato nella regione centrale del lumicano; LRR, ripetizione ricca in leucine [147].

Come componenti biologicamente attivi della ECM, i proteoglicani SLRPs legano vari tipi di collagene, avendo un ruolo nell’assemblaggio e nella modulazione delle fibre. Il nome “decorina” è stato proposto proprio per la capacità di “decorare” le fibre collagene. In queste molecole bifunzionali, il motivo proteico lega le fibre collagene, mentre le catene laterali idrofile si intercalano nelle fibre collagene, regolandone il calibro e l’architettura. Un meccanismo di azione fisiologica comune fra i vari SLRP è quello di legare fattori di crescita e murarli alla ECM a mo’ di *reservoir*, per garantire e regolare la biodisponibilità degli stessi durante lo sviluppo. Più recentemente è stato dimostrato come core proteico e funzionalizzazioni, come ad esempio

il core proteico della DCN o le catene laterali di cheratan-solfati del LUM e della fibromodulina, siano capaci di interagire fisicamente e modulare vari recettori tirosin-chinasici di membrana, citochine, fattori di crescita ed altri componenti della matrice extracellulare [148], influenzando in questo modo varie funzioni cellulari [149] attraverso l'attivazione di vie di segnalazione specifiche. Più recentemente è stato dimostrato come alcuni componenti dei SLRPs abbiano un ruolo attivo nella regolazione e mantenimento della nicchia in cui risiedono le cellule staminali, embrionali e tissutali adulte [59], nelle specificazioni dello strato germinale e neurale (cresta neurale, origine del NBL), nella migrazione e nel differenziamento dei precursori neurali [148] e nella risposta al danno a carico del sistema nervoso centrale [150]. Oltre che in questi aspetti fisiologici, è emerso un ruolo degli SLRP anche nell'angiogenesi [151] e nella trasformazione maligna [152].

La DCN (*Fig. 23*) è stata recentemente definita come il guardiano della ECM per la sua alta promiscuità ed il suo ampio repertorio di interazioni con i costituenti della matrice stessa, fattori di crescita e recettori cellulari di superficie [153]. Essendo un inibitore della maggior parte dei recettori tirosin-chinasici di superficie, la DCN è un costituente della ECM in grado di regolare negativamente una serie di pathways coinvolti nella crescita e nel differenziamento, in condizioni fisiologiche e patologiche. Indagini su campioni umani ed esperimenti basati su modelli animali di infertilità associata ad infiammazione hanno permesso di stabilire una regolazione negativa in forma paracrina attuata dalla DCN a carico della maturazione testicolare a livello della *rete testis* e che l'aumento dell'espressione genica di DCN è dovuto all'induzione da parte di TNF- α prodotto dalle cellule del sistema immunitario migrate nel sito di infiammazione [154].

Nelle linee di neuroblastoma, la trascrizione del gene della DCN correla con geni dell'infiammazione e di danno nervoso e risulta più espressa in presenza del fattore di trascrizione CCAAT/enhancer-binding protein-beta (C/EBPbeta) [155]. Altri studi in modelli animali confermano una modulazione negativa della crescita dei gliomi da parte della DCN e che la sua

espressione ectopica potrebbe rappresentare un potenziale strumento utile nella terapia dei gliomi maligni.

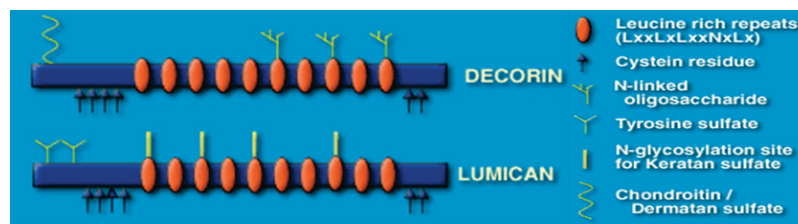


Figura 23 – Decorina e lumicano sono componenti della famiglia dei proteoglicani SLRP. Decorina: proteoglicano con una ramificazione di dermatan-solfato all'N-terminale; glicoproteina con 1-3 ramificazioni N-glicosidiche di catene glucidiche. Lumicano: proteoglicano con 1-4 ramificazioni N-glicosidiche di cheratan-solfato nelle sequenze LRR, regione ricca in leucine; presenza di residui tirosinici solfonati all'N-terminale nella forma glicoproteica.

Il meccanismo di modulazione negativa da parte della DCN in questo caso prevede la sottrazione fisica e la degradazione di TGF-beta rilasciato dalle cellule tumorali, necessario per la proliferazione della massa tumorale [156]. In contrasto, in cellule MB49 di tumore alla vescica, la produzione di DCN *de novo* favorisce la migrazione e l'invasione cellulare. Lo stesso effetto è stato verificato in linee DOK di tumore displastico orale e SCC-25 di carcinoma maligno a cellule squamose, oltre che *in vivo* in pazienti, però in questo caso la DCN veniva espressa in maniera anomala a livello nucleare, promuovendo in questo contesto la trascrizione di geni legati a migrazione ed invasione mediante legame e attivazione di EGFR nucleare [157]. Inoltre, è stato riscontrato un ruolo anti-apoptotico e protettivo della DCN in precursori neuronali e linee di glioma private di ossigeno e glucosio, favorendo la crescita mediante l'attivazione delle vie di p21, p27, Ras ed AKT fosforilato [158]. Questo dato è di estrema importanza se si tiene conto dell'ambiente ipossico in cui si mantengono le cellule staminali, *in vivo* nelle nicchie ed *in vitro* all'interno del modello 3-D delle neurosfere.

Il LUM (*Fig. 23*), come la DCN, fa parte della famiglia dei SLRPs ed ha un ruolo attivo nel mantenimento dell'omeostasi dei tessuti e nella modulazione di numerose funzioni cellulari, in condizioni fisiologiche e patologiche [159], fra cui proliferazione cellulare, migrazione e differenziamento. Il LUM è il

proteoglicano maggiormente espresso nella cornea ed ha un ruolo attivo nella percezione visiva. La trasparenza della cornea è data da un'adeguata organizzazione delle fibre collagene che, disponendosi in modo ordinato, rendono funzionale il tessuto; senza LUM il collagene si stratificherebbe in una maniera disomogenea nella cornea, infatti topi *lum^(-/-)* sviluppano una cornea opaca che impedisce la percezione visiva. In contrasto, l'eccessiva produzione di LUM nel fegato è correlata all'insorgenza di fibrosi epatica [160].

In cellule di osteosarcoma, il LUM inibisce l'adesione e favorisce la migrazione cellulare operando una regolazione del pathway di TGF-beta2/SMAD2, inibendo in questo modo anche geni dell'adesione a valle del pathway, come integrina-beta1 e pFAK [161].

Uno studio clinico su pazienti oncologici, con diagnosi secondaria di glioblastoma, precedentemente trattati con *bevacizumab* e categorizzati in base alla risposta al trattamento, ha permesso di stabilire, attraverso studi di espressione genica differenziale e di immunostaining, un aumento della produzione di DCN, LUM e collagene nei pazienti più resistenti alla terapia. Inoltre la DCN è stata associata ad un tempo di sopravvivenza dei pazienti significativamente minore [162].

La capacità di SPARC di modulare la morfologia cellulare in relazione alla ECM conferisce alla proteina un duplice ruolo nel micro-ambiente tumorale, essendo in grado di inibire la proliferazione di astrociti [138] e linee di neuroblastoma [139] da una parte, e favorire migrazione [140] e promuovere angiogenesi ed episodi metastatici dall'altra [141].

Recentemente, alcuni autori hanno inserito SPARC all'interno di un gruppo di geni chiave nell'invasione cellulare in seguito ad un brillante studio sperimentale in cui è stato ottenuto un fenotipo cellulare migratorio ed invasivo da NSC corticali non tumorali, trattate con FGF e BMP4 [142]. In questo lavoro è interessante notare che l'induzione dell'invasività in cellule *non tumorali* ha permesso di identificare un set significativo di geni - attivati da FGF e coinvolti nello switch fenotipico - e che questi geni (SPARC, *Ngfr*, *Snail1*, ecc) risultano maggiormente espressi *in vivo*, durante od in seguito alla

transizione EMT nella cresta neurale, ed in campioni di pazienti affetti da GBM rispetto a biopsie sane. Questo parallelismo, insieme ai dati argomentati da questa tesi, evidenzia ancora una volta l'esistenza di un'intima connessione tra le cellule staminali e le cellule tumorali circa i meccanismi molecolari che sottendono i fenomeni di migrazione, invasione ed angiogenesi.

Oltre ad una modulazione dell'espressione genica, il LUM ha subito un cambiamento temporale della sua struttura durante l'arricchimento in CSC. Infatti, i dati dell'immunoblotting con anticorpo anti-LUM hanno permesso di osservare un aumento progressivo di LUM dal PM di circa 70 kDa con picco agli 8 giorni di induzione. Questa isoforma dovrebbe corrispondere ad una struttura proteoglicanica del lumicano, associata da altri autori a stimolazione della proliferazione in linee tumorali di pancreas [163, 164].

Presi insieme, i dati della presente tesi suggeriscono che le cellule con proprietà staminali nel modello *in vitro* in questione hanno la capacità di modulare il micro-ambiente circostante attraverso l'espressione di proteoglicani quali DCN, LUM e SPARC, e deposito degli stessi nella ECM. Inoltre, DCN e LUM sembrano avere un ruolo nello sviluppo [165], che richiama necessariamente il nesso fra proprietà staminali e funzioni oncogene.

Per questo motivo è possibile ipotizzare che il destino delle CSC non è deciso completamente dall'ambiente extracellulare e che le CSC possono adottare meccanismi di sopravvivenza e di invasività in risposta a fattori esterni, attraverso l'espressione di fattori della ECM, quali proteoglicani SLRP, in grado di modulare le principali vie di segnalazione cellulari e la composizione biochimica dello stesso micro-ambiente. Traslando questi concetti *in vivo*, sarebbe ipotizzabile un contributo decisivo delle CSC nella modulazione appropriata della loro stessa nicchia. Inoltre, alla luce dei risultati dimostrati, emergono nuove domande circa il ruolo delle SLRP nelle CSC. Ad esempio, 1) I proteoglicani SLRP, oltre a regolare vie note, sono in grado di regolare vie di segnalazione coinvolte nel mantenimento della condizione staminale di cellule neurali (Tab. 6) o avere un ruolo nella transizione EMT? 2) Possono DCN e LUM essere considerati marker trascrizionali di CSC? 3) Possono DCN

e LUM essere considerati come target di farmaci nel trattamento di GBM e NBL?

Tabella 6 – Principali vie di segnalazione dai proteoglicani SLRP [148].

SRLP	TGF- β Smad2	BMP Smad1	Met	MAPK FGF	EGF	IGF	Hedgehog	Wnt	Notch
DCN	+	+	+	+	+	+	?	?	?
LUM	+	ND	ND	+	+	ND	?	?	?

Per meglio caratterizzare il dato biologico, confermare le ipotesi emerse dalla tesi e rispondere alle domande elencate in precedenza occorre uno studio di approfondimento circa la funzionalità oncogenica ed invasiva delle cellule indotte, in seguito a *knockdown* di DCN e LUM nelle CSC del SNC; inoltre, sarà necessario intraprendere un percorso che vada a comprendere se l'aumento di SLRP descritto in linee di GBM ed NBL indotte in NSC SFM sia un meccanismo comune alle cellule tumorali di vari distretti corporei o sia tessuto-specifico, o, addirittura, se possa essere un meccanismo conservato delle fasi dello sviluppo, come proposto da vari autori per altri fattori genetici [166]. Inoltre non si esclude un ruolo intranucleare aberrante dei SLRP, descritto in precedenza da altri autori.

Lo sviluppo della presente tesi ha permesso una maggior comprensione circa le dinamiche funzionali e molecolari che accompagnano fenomeni di de-differenziamento verso fenotipi con proprietà staminali (tipico processo della transizione EMT). Infine, dati di un modello *in vitro* eccezionalmente simile allo scenario *in vivo*, possono essere prodromo per un approccio di tipo pre-clinico e clinico in successivi saggi funzionali dei geni coinvolti ed impianto di progenitori mutati in topi immunodepressi per valutare l'oncogenicità delle cellule *in vivo*. Ulteriori indagini cliniche potrebbero valutare l'utilità di questi marker nella diagnosi, nella prognosi e, come nuovi bersagli terapeutici, nel trattamento dei tumori del sistema nervoso che presentano profili "blastici".

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Sperry RW: **Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1963, **50**:703-710.
2. Taupin P, Gage FH: **Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals.** *Journal of neuroscience research* 2002, **69**(6):745-749.
3. Bailey KJ, Maslov AY, Pruitt SC: **Accumulation of mutations and somatic selection in aging neural stem/progenitor cells.** *Aging cell* 2004, **3**(6):391-397.
4. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL: **Stem cells, cancer, and cancer stem cells.** *Nature* 2001, **414**(6859):105-111.
5. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ: **Applying the principles of stem-cell biology to cancer.** *Nature reviews Cancer* 2003, **3**(12):895-902.
6. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA: **Brain tumour stem cells.** *Nature reviews Cancer* 2006, **6**(6):425-436.
7. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM: **Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells.** *Cancer research* 2006, **66**(19):9339-9344.
8. Khalil MA, Hrabeta J, Cipro S, Stiborova M, Vicha A, Eckschlager T: **Neuroblastoma stem cells - mechanisms of chemoresistance and histone deacetylase inhibitors.** *Neoplasma* 2012, **59**(6):737-746.
9. Beier D, Schulz JB, Beier CP: **Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected.** *Molecular cancer* 2011, **10**:128.
10. Li WQ, Li YM, Tao BB, Lu YC, Hu GH, Liu HM, He J, Xu Y, Yu HY: **Downregulation of ABCG2 expression in glioblastoma cancer stem cells with miRNA-328 may decrease their chemoresistance.** *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2010, **16**(10):HY27-30.
11. Nakai E, Park K, Yawata T, Chihara T, Kumazawa A, Nakabayashi H, Shimizu K: **Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma.** *Cancer investigation* 2009, **27**(9):901-908.
12. Bleau AM, Huse JT, Holland EC: **The ABCG2 resistance network of glioblastoma.** *Cell cycle* 2009, **8**(18):2936-2944.
13. Omuro A, DeAngelis LM: **Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2013, **310**(17):1842-1850.
14. Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, Fulton D, Hagen NA, MacKinnon JA, Sutherland G, Cairncross JG, Forsyth P: **Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study.** *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques* 1998, **25**(3):197-201.
15. Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, Fulton D, MacKinnon JA, Hamilton M, Cairncross JG, Forsyth P: **Which glioblastoma multiforme patient will become**

- a long-term survivor? A population-based study.** *Annals of neurology* 1999, **46**(2):183-188.
16. McLendon RE, Halperin EC: **Is the long-term survival of patients with intracranial glioblastoma multiforme overstated?** *Cancer* 2003, **98**(8):1745-1748.
 17. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U *et al*: **Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.** *The New England journal of medicine* 2005, **352**(10):987-996.
 18. Chamberlain MC, Glantz MJ, Chalmers L, Van Horn A, Sloan AE: **Early necrosis following concurrent Temodar and radiotherapy in patients with glioblastoma.** *Journal of neuro-oncology* 2007, **82**(1):81-83.
 19. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL: **Neuroblastoma.** *Lancet* 2007, **369**(9579):2106-2120.
 20. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB *et al*: **International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee.** *British journal of cancer* 2009, **100**(9):1471-1482.
 21. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, Carter SL, Cibulskis K, Hanna M, Kiezun A *et al*: **The genetic landscape of high-risk neuroblastoma.** *Nature genetics* 2013, **45**(3):279-284.
 22. Cheung NK, Dyer MA: **Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy.** *Nature reviews Cancer* 2013, **13**(6):397-411.
 23. Dahlrot RH, Hermansen SK, Hansen S, Kristensen BW: **What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas?** *International journal of clinical and experimental pathology* 2013, **6**(3):334-348.
 24. Sottoriva A, Verhoeff JJ, Borovski T, McWeeney SK, Naumov L, Medema JP, Sloot PM, Vermeulen L: **Cancer stem cell tumor model reveals invasive morphology and increased phenotypical heterogeneity.** *Cancer research* 2010, **70**(1):46-56.
 25. Clevers H: **The cancer stem cell: premises, promises and challenges.** *Nature medicine* 2011, **17**(3):313-319.
 26. Rahman M, Deleyrolle L, Vedam-Mai V, Azari H, Abd-El-Barr M, Reynolds BA: **The cancer stem cell hypothesis: failures and pitfalls.** *Neurosurgery* 2011, **68**(2):531-545; discussion 545.
 27. Siapati EK, Rouka E, Kyriakou D, Vassilopoulos G: **Neuroblastoma cells negative for CD44 possess tumor-initiating properties.** *Cellular oncology* 2011, **34**(3):189-197.
 28. Beier CP, Beier D: **CD133 negative cancer stem cells in glioblastoma.** *Front Biosci (Elite Ed)* 2011, **3**:701-710.

29. Melguizo C, Prados J, Gonzalez B, Ortiz R, Concha A, Alvarez PJ, Madeddu R, Perazzoli G, Oliver JA, Lopez R *et al*: **MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy.** *Journal of translational medicine* 2012, **10**:250.
30. Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y: **Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis.** *Cell research* 2007, **17**(1):3-14.
31. Nieto MA: **Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives.** *The International journal of developmental biology* 2009, **53**(8-10):1541-1547.
32. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.** *Cell* 2009, **139**(5):871-890.
33. Thiery JP, Sleeman JP: **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2006, **7**(2):131-142.
34. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J: **Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis.** *Cancer cell* 2012, **22**(6):725-736.
35. Ocana OH, Corcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, Barrallo-Gimeno A, Cano A, Nieto MA: **Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1.** *Cancer cell* 2012, **22**(6):709-724.
36. Chaffer CL, Weinberg RA: **A perspective on cancer cell metastasis.** *Science* 2011, **331**(6024):1559-1564.
37. Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Yamashita M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F: **Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells.** *Int J Oncol* 2007, **31**(2):277-283.
38. Massague J: **TGFbeta in Cancer.** *Cell* 2008, **134**(2):215-230.
39. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M *et al*: **The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.** *Cell* 2008, **133**(4):704-715.
40. Singh A, Settleman J: **EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer.** *Oncogene* 2010, **29**(34):4741-4751.
41. Hynes RO: **The extracellular matrix: not just pretty fibrils.** *Science* 2009, **326**(5957):1216-1219.
42. Prindull G, Zipori D: **Environmental guidance of normal and tumor cell plasticity: epithelial mesenchymal transitions as a paradigm.** *Blood* 2004, **103**(8):2892-2899.
43. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.

44. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
45. Lazebnik Y: **What are the hallmarks of cancer?** *Nature reviews Cancer* 2010, **10**(4):232-233.
46. Mazzoleni S, Politi LS, Pala M, Cominelli M, Franzin A, Sergi L, Falini A, De Palma M, Bulfone A, Poliani PL *et al*: **Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis.** *Cancer research* 2010, **70**(19):7500-7513.
47. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K: **Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010, **16**(3):876-887.
48. Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL, Cheung NK, Ross RA: **Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors.** *Neoplasia* 2004, **6**(6):838-845.
49. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW: **Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells.** *Science* 2009, **324**(5935):1673-1677.
50. Reilly GC, Engler AJ: **Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation.** *Journal of biomechanics* 2010, **43**(1):55-62.
51. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Ertler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W *et al*: **Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling.** *Cell* 2009, **139**(5):891-906.
52. Borovski T, De Sousa EMF, Vermeulen L, Medema JP: **Cancer stem cell niche: the place to be.** *Cancer research* 2011, **71**(3):634-639.
53. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M *et al*: **A perivascular niche for brain tumor stem cells.** *Cancer cell* 2007, **11**(1):69-82.
54. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, Richel DJ, Stassi G, Medema JP: **Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(36):13427-13432.
55. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, Kwon HY, Kim J, Chute JP, Rizzieri D *et al*: **Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia.** *Nature* 2009, **458**(7239):776-779.
56. Bissell MJ, Hines WC: **Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression.** *Nature medicine* 2011, **17**(3):320-329.
57. Reya T, Clevers H: **Wnt signalling in stem cells and cancer.** *Nature* 2005, **434**(7035):843-850.

58. Infanger DW, Cho Y, Lopez BS, Mohanan S, Liu SC, Gursel D, Boockvar JA, Fischbach C: **Glioblastoma stem cells are regulated by interleukin-8 signaling in a tumoral perivascular niche.** *Cancer research* 2013.
59. Brizzi MF, Tarone G, Defilippi P: **Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche.** *Current opinion in cell biology* 2012, **24**(5):645-651.
60. Yan K, Yang K, Rich JN: **The evolving landscape of glioblastoma stem cells.** *Current opinion in neurology* 2013.
61. Tadeo I, Piqueras M, Montaner D, Villamon E, Berbegall AP, Canete A, Navarro S, Noguera R: **Quantitative modeling of clinical, cellular and extracellular matrix variables suggest prognostic indicators in cancer. A model in neuroblastoma.** *Pediatric research* 2013.
62. Brandenberger R, Wei H, Zhang S, Lei S, Murage J, Fisk GJ, Li Y, Xu C, Fang R, Guegler K *et al*: **Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation.** *Nature biotechnology* 2004, **22**(6):707-716.
63. Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Koh C, Zhang J, Li YM, Maciaczyk J *et al*: **NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts.** *Stem cells* 2010, **28**(1):5-16.
64. Garner JM, Fan M, Yang CH, Du Z, Sims M, Davidoff AM, Pfeffer LM: **Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and nuclear factor kappaB signaling in glioblastoma cancer stem cells regulates the Notch pathway.** *The Journal of biological chemistry* 2013, **288**(36):26167-26176.
65. Bilir B, Kucuk O, Moreno CS: **Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells.** *Journal of translational medicine* 2013, **11**(1):280.
66. Voloshanenko O, Erdmann G, Dubash TD, Augustin I, Metzigg M, Moffa G, Hundsrucker C, Kerr G, Sandmann T, Anchang B *et al*: **Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells.** *Nature communications* 2013, **4**:2610.
67. Gong A, Huang S: **FoxM1 and Wnt/beta-catenin signaling in glioma stem cells.** *Cancer research* 2012, **72**(22):5658-5662.
68. Morris JPt, Wang SC, Hebrok M: **KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Nature reviews Cancer* 2010, **10**(10):683-695.
69. Rampazzo E, Persano L, Pistollato F, Moro E, Frasson C, Porazzi P, Della Puppa A, Bresolin S, Battilana G, Indraccolo S *et al*: **Wnt activation promotes neuronal differentiation of glioblastoma.** *Cell death & disease* 2013, **4**:e500.
70. Beier D, Rohrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Trampe-Kieslich A *et al*: **Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma.** *Cancer research* 2008, **68**(14):5706-5715.

71. Pallini R, Montano N, Larocca LM: **Comment re: Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells.** *Cancer research* 2009, **69**(15):6364; author reply 6365.
72. Ahmed AU, Auffinger B, Lesniak MS: **Understanding glioma stem cells: rationale, clinical relevance and therapeutic strategies.** *Expert review of neurotherapeutics* 2013, **13**(5):545-555.
73. Wang K, Wu X, Wang J, Huang J: **Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine.** *International journal of nanomedicine* 2013, **8**:899-908.
74. Reynolds BA, Weiss S: **Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.** *Science* 1992, **255**(5052):1707-1710.
75. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S: **A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1992, **12**(11):4565-4574.
76. Parmar M, Skogh C, Bjorklund A, Campbell K: **Regional specification of neurosphere cultures derived from subregions of the embryonic telencephalon.** *Molecular and cellular neurosciences* 2002, **21**(4):645-656.
77. Ostenfeld T, Joly E, Tai YT, Peters A, Caldwell M, Jauniaux E, Svendsen CN: **Regional specification of rodent and human neurospheres.** *Brain research Developmental brain research* 2002, **134**(1-2):43-55.
78. Hitoshi S, Tropepe V, Ekker M, van der Kooy D: **Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain.** *Development* 2002, **129**(1):233-244.
79. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS: **In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells.** *Genes & development* 2003, **17**(10):1253-1270.
80. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK: **A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(39):14228-14233.
81. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A: **Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma.** *Cancer research* 2004, **64**(19):7011-7021.
82. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB: **Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.** *Cancer research* 2003, **63**(18):5821-5828.
83. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB: **Identification of human brain tumour initiating cells.** *Nature* 2004, **432**(7015):396-401.

84. Irvin DK, Dhaka A, Hicks C, Weinmaster G, Kornblum HI: **Extrinsic and intrinsic factors governing cell fate in cortical progenitor cultures.** *Developmental neuroscience* 2003, **25**(2-4):162-172.
85. Tropepe V, Sibilio M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D: **Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon.** *Developmental biology* 1999, **208**(1):166-188.
86. Ernst A, Hofmann S, Ahmadi R, Becker N, Korshunov A, Engel F, Hartmann C, Felsberg J, Sabel M, Peterziel H *et al*: **Genomic and expression profiling of glioblastoma stem cell-like spheroid cultures identifies novel tumor-relevant genes associated with survival.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, **15**(21):6541-6550.
87. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W *et al*: **Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines.** *Cancer cell* 2006, **9**(5):391-403.
88. Reynolds BA, Weiss S: **Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell.** *Developmental biology* 1996, **175**(1):1-13.
89. Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S: **bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells.** *Neuron* 1993, **11**(5):951-966.
90. Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD *et al*: **Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1996, **16**(3):1091-1100.
91. Woolard K, Fine HA: **Glioma stem cells: better flat than round.** *Cell stem cell* 2009, **4**(6):466-467.
92. Persano L, Rampazzo E, Della Puppa A, Pistollato F, Basso G: **The three-layer concentric model of glioblastoma: cancer stem cells, microenvironmental regulation, and therapeutic implications.** *TheScientificWorldJournal* 2011, **11**:1829-1841.
93. Aguirre A, Rubio ME, Gallo V: **Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal.** *Nature* 2010, **467**(7313):323-327.
94. Arsenijevic Y, Weiss S, Schneider B, Aebischer P: **Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2001, **21**(18):7194-7202.
95. Arsenijevic Y, Villemure JG, Brunet JF, Bloch JJ, Deglon N, Kostic C, Zurn A, Aebischer P: **Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain.** *Experimental neurology* 2001, **170**(1):48-62.

96. Galli R: **The neurosphere assay applied to neural stem cells and cancer stem cells.** *Methods in molecular biology* 2013, **986**:267-277.
97. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI: **Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(25):15178-15183.
98. Tunici P, Bissola L, Lualdi E, Pollo B, Cajola L, Broggi G, Sozzi G, Finocchiaro G: **Genetic alterations and in vivo tumorigenicity of neurospheres derived from an adult glioblastoma.** *Molecular cancer* 2004, **3**:25.
99. Coulon A, Flahaut M, Muhlethaler-Mottet A, Meier R, Liberman J, Balmas-Bourlout K, Nardou K, Yan P, Tercier S, Joseph JM *et al*: **Functional sphere profiling reveals the complexity of neuroblastoma tumor-initiating cell model.** *Neoplasia* 2011, **13**(10):991-1004.
100. Liu QX, Tang JY, Cai JY, Yin MZ, Li BS: **The cultivation and identification of tumor stem cells from neuroblastoma derived tumor spheres.** *Chinese journal of cancer* 2010, **29**(12):1012-1017.
101. Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A, Kamijo T: **CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification.** *Oncogene* 2011, **30**(1):97-105.
102. Kumar HR, Zhong X, Hoelz DJ, Rescorla FJ, Hickey RJ, Malkas LH, Sandoval JA: **Three-dimensional neuroblastoma cell culture: proteomic analysis between monolayer and multicellular tumor spheroids.** *Pediatric surgery international* 2008, **24**(11):1229-1234.
103. Hansford LM, McKee AE, Zhang L, George RE, Gerstle JT, Thorner PS, Smith KM, Look AT, Yeger H, Miller FD *et al*: **Neuroblastoma cells isolated from bone marrow metastases contain a naturally enriched tumor-initiating cell.** *Cancer research* 2007, **67**(23):11234-11243.
104. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M: **A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas.** *Cancer research* 2005, **65**(20):9328-9337.
105. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R: **Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells.** *Nature* 2007, **445**(7123):111-115.
106. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP *et al*: **Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4.** *Cell stem cell* 2007, **1**(4):389-402.
107. Lin L, Liu A, Peng Z, Lin HJ, Li PK, Li C, Lin J: **STAT3 is necessary for proliferation and survival in colon cancer-initiating cells.** *Cancer research* 2011, **71**(23):7226-7237.
108. Fang DD, Kim YJ, Lee CN, Aggarwal S, McKinnon K, Mesmer D, Norton J, Birse CE, He T, Ruben SM *et al*: **Expansion of CD133(+) colon cancer cultures retaining stem cell properties to enable cancer stem cell target discovery.** *British journal of cancer* 2010, **102**(8):1265-1275.

109. Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, Struhl K: **Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(4):1397-1402.
110. Singh S, Trevino J, Bora-Singhal N, Coppola D, Haura E, Altiook S, Chellappan SP: **EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer.** *Molecular cancer* 2012, **11**:73.
111. Shi Y, Fu X, Hua Y, Han Y, Lu Y, Wang J: **The side population in human lung cancer cell line NCI-H460 is enriched in stem-like cancer cells.** *PloS one* 2012, **7**(3):e33358.
112. Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R: **Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population.** *Cell death and differentiation* 2008, **15**(3):504-514.
113. Pan Z, Hooley J, Smith DH, Young P, Roberts PE, Mather JP: **Establishment of human ovarian serous carcinomas cell lines in serum free media.** *Methods* 2012, **56**(3):432-439.
114. Kryczek I, Liu S, Roh M, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Banerjee M, Mao Y, Kotarski J, Wicha MS *et al*: **Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2012, **130**(1):29-39.
115. Ma L, Lai D, Liu T, Cheng W, Guo L: **Cancer stem-like cells can be isolated with drug selection in human ovarian cancer cell line SKOV3.** *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2010, **42**(9):593-602.
116. Shi MF, Jiao J, Lu WG, Ye F, Ma D, Dong QG, Xie X: **Identification of cancer stem cell-like cells from human epithelial ovarian carcinoma cell line.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2010, **67**(22):3915-3925.
117. Chaichana K, Zamora-Berridi G, Camara-Quintana J, Quinones-Hinojosa A: **Neurosphere assays: growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies.** *Stem cells* 2006, **24**(12):2851-2857.
118. Pilkington GJ: **Cancer stem cells in the mammalian central nervous system.** *Cell proliferation* 2005, **38**(6):423-433.
119. Qiang L, Yang Y, Ma YJ, Chen FH, Zhang LB, Liu W, Qi Q, Lu N, Tao L, Wang XT *et al*: **Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines.** *Cancer letters* 2009, **279**(1):13-21.
120. Wu C, Alman BA: **Side population cells in human cancers.** *Cancer letters* 2008, **268**(1):1-9.
121. Qi S, Zheng J, Zhu H, Yang L, Xiao X: **Identification of neuroblastoma stem cells by characterization of side population cells in the human neuroblastoma SK-N-SH cell line.** *Journal of pediatric surgery* 2010, **45**(12):2305-2311.

122. Zhou ZH, Ping YF, Yu SC, Yi L, Yao XH, Chen JH, Cui YH, Bian XW: **A novel approach to the identification and enrichment of cancer stem cells from a cultured human glioma cell line.** *Cancer letters* 2009, **281**(1):92-99.
123. Seaberg RM, van der Kooy D: **Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions.** *Trends in neurosciences* 2003, **26**(3):125-131.
124. Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D: **Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1999, **19**(11):4462-4471.
125. Rutka JT, Giblin JR, Dougherty DY, Liu HC, McCulloch JR, Bell CW, Stern RS, Wilson CB, Rosenblum ML: **Establishment and characterization of five cell lines derived from human malignant gliomas.** *Acta neuropathologica* 1987, **75**(1):92-103.
126. Kornblith PL, Szytko PE: **Variations in response of human brain tumors to BCNU in vitro.** *Journal of neurosurgery* 1978, **48**(4):580-586.
127. Rota LM, Lazzarino DA, Ziegler AN, LeRoith D, Wood TL: **Determining mammosphere-forming potential: application of the limiting dilution analysis.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2012, **17**(2):119-123.
128. Bez A, Corsini E, Curti D, Biggiogera M, Colombo A, Nicosia RF, Pagano SF, Parati EA: **Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization.** *Brain research* 2003, **993**(1-2):18-29.
129. Lee JP, Jeyakumar M, Gonzalez R, Takahashi H, Lee PJ, Baek RC, Clark D, Rose H, Fu G, Clarke J *et al*: **Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease.** *Nature medicine* 2007, **13**(4):439-447.
130. Wu P, Zuo X, Deng H, Liu X, Liu L, Ji A: **Roles of long noncoding RNAs in brain development, functional diversification and neurodegenerative diseases.** *Brain research bulletin* 2013, **97**:69-80.
131. Young TL, Matsuda T, Cepko CL: **The noncoding RNA taurine upregulated gene 1 is required for differentiation of the murine retina.** *Current biology : CB* 2005, **15**(6):501-512.
132. Cao WJ, Wu HL, He BS, Zhang YS, Zhang ZY: **Analysis of long non-coding RNA expression profiles in gastric cancer.** *World journal of gastroenterology : WJG* 2013, **19**(23):3658-3664.
133. Han Y, Liu Y, Gui Y, Cai Z: **Long intergenic non-coding RNA TUG1 is overexpressed in urothelial carcinoma of the bladder.** *Journal of surgical oncology* 2013, **107**(5):555-559.
134. Harrow J, Frankish A, Gonzalez JM, Tapanari E, Diekhans M, Kokocinski F, Aken BL, Barrell D, Zadissa A, Searle S *et al*: **GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project.** *Genome research* 2012, **22**(9):1760-1774.

135. Alford AI, Hankenson KD: **Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration.** *Bone* 2006, **38**(6):749-757.
136. Francki A, McClure TD, Brekken RA, Motamed K, Murri C, Wang T, Sage EH: **SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells.** *Journal of cellular biochemistry* 2004, **91**(5):915-925.
137. Bradshaw AD: **Diverse biological functions of the SPARC family of proteins.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2012, **44**(3):480-488.
138. Capper D, Mittelbronn M, Goeppert B, Meyermann R, Schittenhelm J: **Secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) expression in astrocytic tumour cells negatively correlates with proliferation, while vascular SPARC expression is associated with patient survival.** *Neuropathology and applied neurobiology* 2010, **36**(3):183-197.
139. Bhoopathi P, Gorantla B, Sailaja GS, Gondi CS, Gujrati M, Klopfenstein JD, Rao JS: **SPARC overexpression inhibits cell proliferation in neuroblastoma and is partly mediated by tumor suppressor protein PTEN and AKT.** *PloS one* 2012, **7**(5):e36093.
140. Kunigal S, Gondi CS, Gujrati M, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Rao JS: **SPARC-induced migration of glioblastoma cell lines via uPA-uPAR signaling and activation of small GTPase RhoA.** *Int J Oncol* 2006, **29**(6):1349-1357.
141. Rivera LB, Bradshaw AD, Brekken RA: **The regulatory function of SPARC in vascular biology.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2011, **68**(19):3165-3173.
142. Sailer MH, Gerber A, Tostado C, Hutter G, Cordier D, Mariani L, Ritz MF: **Non-invasive neural stem cells become invasive in vitro by combined FGF2 and BMP4 signaling.** *Journal of cell science* 2013, **126**(Pt 16):3533-3540.
143. Junttila MR, de Sauvage FJ: **Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response.** *Nature* 2013, **501**(7467):346-354.
144. Orr BA, Eberhart CG: **Nature versus nurture in glioblastoma: microenvironment and genetics can both drive mesenchymal transcriptional signature.** *The American journal of pathology* 2012, **180**(5):1768-1771.
145. Bonavia R, Inda MM, Cavenee WK, Furnari FB: **Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network.** *Cancer research* 2011, **71**(12):4055-4060.
146. Foong CS, Ng FS, Phong M, Toh TB, Chong YK, Tucker-Kellogg G, Campbell RM, Ang BT, Tang C: **Cryopreservation of cancer-initiating cells derived from glioblastoma.** *Frontiers in bioscience* 2011, **3**:698-708.
147. Roughley PJ: **The structure and function of cartilage proteoglycans.** *European cells & materials* 2006, **12**:92-101.
148. Dellett M, Hu W, Papadaki V, Ohnuma S: **Small leucine rich proteoglycan family regulates multiple signalling pathways in neural development and maintenance.** *Development, growth & differentiation* 2012, **54**(3):327-340.

149. Iozzo RV, Schaefer L: **Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans.** *The FEBS journal* 2010, **277**(19):3864-3875.
150. Logan A, Baird A, Berry M: **Decorin attenuates gliotic scar formation in the rat cerebral hemisphere.** *Experimental neurology* 1999, **159**(2):504-510.
151. Iozzo RV, Sanderson RD: **Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2011, **15**(5):1013-1031.
152. Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK: **Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting.** *The FEBS journal* 2010, **277**(19):3904-3923.
153. Neill T, Schaefer L, Iozzo RV: **Decorin: a guardian from the matrix.** *The American journal of pathology* 2012, **181**(2):380-387.
154. Adam M, Urbanski HF, Garyfallou VT, Welsch U, Kohn FM, Ullrich Schwarzer J, Strauss L, Poutanen M, Mayerhofer A: **High levels of the extracellular matrix proteoglycan decorin are associated with inhibition of testicular function.** *International journal of andrology* 2012, **35**(4):550-561.
155. Cortes-Canteli M, Wagner M, Ansorge W, Perez-Castillo A: **Microarray analysis supports a role for ccaat/enhancer-binding protein-beta in brain injury.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(14):14409-14417.
156. Biglari A, Bataille D, Naumann U, Weller M, Zirger J, Castro MG, Lowenstein PR: **Effects of ectopic decorin in modulating intracranial glioma progression in vivo, in a rat syngeneic model.** *Cancer gene therapy* 2004, **11**(11):721-732.
157. Dil N, Banerjee AG: **A role for aberrantly expressed nuclear localized decorin in migration and invasion of dysplastic and malignant oral epithelial cells.** *Head & neck oncology* 2011, **3**:44.
158. Santra M, Katakowski M, Zhang RL, Zhang ZG, Meng H, Jiang F, Chopp M: **Protection of adult mouse progenitor cells and human glioma cells by de novo decorin expression in an oxygen- and glucose-deprived cell culture model system.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2006, **26**(10):1311-1322.
159. Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN: **Lumican, a small leucine-rich proteoglycan.** *IUBMB life* 2008, **60**(12):818-823.
160. Krishnan A, Li X, Kao WY, Viker K, Butters K, Masuoka H, Knudsen B, Gores G, Charlton M: **Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2012, **92**(12):1712-1725.
161. Nikitovic D, Chalkiadaki G, Berdiaki A, Aggelidakis J, Katonis P, Karamanos NK, Tzanakakis GN: **Lumican regulates osteosarcoma cell adhesion by modulating TGFbeta2 activity.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2011, **43**(6):928-935.

162. Pope WB, Mirsadraei L, Lai A, Eskin A, Qiao J, Kim HJ, Ellingson B, Nghiemphu PL, Kharbanda S, Soriano RH *et al*: **Differential gene expression in glioblastoma defined by ADC histogram analysis: relationship to extracellular matrix molecules and survival.** *AJNR American journal of neuroradiology* 2012, **33**(6):1059-1064.
163. Yamamoto T, Matsuda Y, Kawahara K, Ishiwata T, Naito Z: **Secreted 70kDa lumican stimulates growth and inhibits invasion of human pancreatic cancer.** *Cancer letters* 2012, **320**(1):31-39.
164. Radwanska A, Litwin M, Nowak D, Baczynska D, Wegrowski Y, Maquart FX, Malicka-Blaszkiewicz M: **Overexpression of lumican affects the migration of human colon cancer cells through up-regulation of gelsolin and filamentous actin reorganization.** *Experimental cell research* 2012, **318**(18):2312-2323.
165. Zagris N, Gilipathi K, Soulintzi N, Konstantopoulos K: **Decorin developmental expression and function in the early avian embryo.** *The International journal of developmental biology* 2011, **55**(6):633-639.
166. Lee WK, Chakraborty PK, Thevenod F: **Pituitary homeobox 2 (PITX2) protects renal cancer cell lines against doxorubicin toxicity by transcriptional activation of the multidrug transporter ABCB1.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2013, **133**(3):556-567.