



**SAPIENZA**  
UNIVERSITA' DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE  
XXXI CICLO**

**“Studio della regolazione trascrizionale della Stearoyl-CoA  
Desaturase 1 (SCD1) in Cellule Staminali Tumorali di  
adenocarcinoma del polmone”**

**DOTTORANDA**

**Claudia De Vitis**

**DOCENTE GUIDA**

**Prof.ssa Rita Mancini**

**COORDINATORE DEL DOTTORATO  
Prof. Maurizio Sorice**

**ANNO ACCADEMICO 2017-2018**

Accompagnarti per certi angoli del presente,  
che fortunatamente diventeranno curve nella memoria.

Quando domani ci accorgeremo che non ritorna mai più niente,  
ma finalmente accetteremo il fatto come una vittoria.

Buon viaggio Papino mio...

## RIASSUNTO

Le Cellule Staminali Tumorali (CSCs) rappresentano una sottopopolazione di cellule tumorali in grado di auto-rinnovarsi differenziandosi. Recenti evidenze suggeriscono che Stearoyl-CoA-desaturasi 1 (SCD1), enzima coinvolto nella sintesi degli acidi grassi monoinsaturi a partire dagli acidi grassi saturi, ha un ruolo in diverse neoplasie. Il gruppo di Ricerca studia da anni il ruolo di SCD1 nel tumore al polmone, il presente lavoro approfondisce gli aspetti legati alla sopravvivenza e alla propagazione delle CSCs confinando il sistema biologico all'adenocarcinoma polmonare.

Nella prima parte della trattazione sono state utilizzate le linee primarie derivanti da versamento pleurico di adenocarcinoma del polmone, al fine di studiare gli effettori del pathway di Hippo, YAP e TAZ. In seguito all'inibizione di SCD1, le cellule 3D mostrano una riduzione di YAP/TAZ. La regolazione di YAP/TAZ da parte di SCD1 dipende anche dall'attività di  $\beta$ -catenina, poiché è stato dimostrato che la downregolazione di YAP/TAZ, indotta dal blocco di SCD1, può essere revertita con l'aggiunta del ligando esogeno. Affinché ci sia attivazione di SCD1 e di YAP/TAZ è necessario che il complesso di distruzione di  $\beta$ -catenina sia inattivo. In linea con i risultati *in vitro*, l'analisi immunohistochemica dei campioni di adenocarcinoma polmonare ha mostrato che i livelli di espressione di SCD1 covariano con quelli di  $\beta$ -catenina e YAP/TAZ. I set di dati di espressione genica hanno permesso di osservare che gli elevati livelli di co-espressione di SCD1,  $\beta$ -catenina, YAP/TAZ e dei geni target hanno un forte valore prognostico negativo nell'adenocarcinoma polmonare. Infine, le analisi bioinformatiche, volte a identificare quali combinazioni geniche hanno avuto effetti sinergici sull'*outcome* clinico, hanno mostrato che una scarsa sopravvivenza è associata ad alta co-espressione di SCD1,  $\beta$ -catenina e YAP/TAZ e del gene target, birc5. Il recente lavoro pubblicato dimostra per la prima volta il coinvolgimento di SCD1 nella regolazione del *pathway* di Hippo nell'adenocarcinoma del polmone, e propone il metabolismo degli acidi grassi come regolatore chiave delle CSCs (Noto et al., 2017).

Nella seconda parte del lavoro di Dottorato, lo studio approfondisce il meccanismo trascrizionale responsabile della regolazione di SCD1 nelle CSCs. Quindi, l'attenzione si è focalizzata sullo studio del promotore del gene SCD1. L'analisi bioinformatica è stata effettuata al fine di individuare i putativi siti di legame dei Fattori Trascrizionali implicati nella sua regolazione. I Fattori Trascrizionali identificati mediante analisi bioinformatica sono: Sterol-Regulated-Element-Binding-1 (SREPB-1), c-MYC, Fattore Nucleare Y (-YA e -YB) e il Fattore Nucleare kB (NF- kB). Sono state determinate le porzioni di arricchimento dei suddetti Fattori Trascrizionali mediante immunoprecipitazione della cromatina (ChIP-qPCR) nella regione di interesse del promotore. Dai risultati emerge che, il passaggio da cellule cresciute in condizioni di aderenza a sferoidi, presenta un importante arricchimento dei siti di legame dei Fattori Trascrizionali sul promotore di SCD1. Al fine di identificare i Fattori Trascrizionali che assumono importanza direttamente o indirettamente nelle CSCs, è stato effettuato il silenziamento genico per valutare se l'inibizione dell'attività possa esser riflessa sull'espressione di SCD1. Infatti, la regolazione di SCD1 in CSCs è influenzata dalla presenza di SREPB1 e NF-Y. Considerando i risultati ottenuti, l'obiettivo è stato quello di effettuare la mutagenesi sul promotore di SCD1, mediante il sistema CRISPR/Cas9 per ottenere dei cloni stabili che indicassero la porzione di promotore efficiente nella regolazione trascrizionale di SCD1 in CSCs. La generazione del clone PR\_1Δ, in seguito a saggi funzionali, mostra una diminuzione dell'espressione di SCD1 e una ridotta capacità di formazione di cellule in 3D, poichè è stata deleta la porzione in cui sono presenti i siti di legame di SREBP1 e c-MYC e NF-kB. In futuro verranno approfondite le analisi di genomica funzionale del trascrittoma e di accessibilità della cromatina, sia circostanziate al promotore di SCD1 che ampliate nelle CSCs. Le informazioni che ne deriveranno ci permetteranno di rafforzare le informazioni e le terapie verso l'adenocarcinoma del polmone.

## ABSTRACT

Cancer Stem Cells (CSCs) are an uncommon subset of tumor cells capable of self-renewal, differentiating. Recent evidences suggest that Stearoyl-CoA-desaturase 1 (SCD1), the enzyme involved in monounsaturated fatty acids synthesis, has a role in several cancers. The Research's group has been studying the roles of SCD1 for many years. The present work delves into aspects related to CSCs survival and propagation by confining the biological system to lung adenocarcinoma.

In the first part, using primary cell cultures from human lung adenocarcinoma, that the effectors of the Hippo pathway, Yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) are require for the generation of 3D cells. SCD1 knockdown decrease expression of YAP and TAZ. Regulation of YAP/TAZ by SCD1 is at least in part dependent upon  $\beta$ -catenin pathway activity, as YAP/TAZ downregulation induced by SCD1 blockade can be rescued by the addition of exogenous ligand. In addition, SCD1 activation of nuclear YAP/TAZ requires inactivation of the  $\beta$ -catenin destruction complex. In line with the in vitro findings, immunohistochemistry analysis of lung adenocarcinoma samples showed that expression levels of SCD1 co-vary with those of  $\beta$ -catenin and YAP/TAZ. Mining available gene expression data sets allowed to observe that high co-expression levels of SCD1,  $\beta$ -catenin, YAP/TAZ and downstream targets have a strong negative prognostic value in lung adenocarcinoma. Finally, bioinformatics analyses directed to identify which gene combinations had synergistic effects on clinical outcome in lung cancer showed that poor survival is associated with high co-expression of SCD1,  $\beta$ -catenin and the YAP/TAZ downstream target birc5. In summary, our data demonstrate for the first time the involvement of SCD1 in the regulation of the Hippo pathway in lung cancer, and point to fatty acids metabolism as a key regulator of lung CSCs (Noto et al., 2017).

The second part of the study explores the transcription regulation of in CSCs. Hence, the attention was focalize on the study of the SCD1 gene promoter. The bioinformatics analysis was performed in order to identify the putative transcription factors binding sites of involved in SCD1 regulation. Binding of the most interesting Transcription Factors, namely Sterol-Regulated-Element-

Binding-1 (SREPB-1), c-MYC, Nuclear Factor Y (NF-YA and NF-YB) and NF-kB was assessed by ChIP assays both in 2D cultures and in 3D spheroids enriched of CSC. Interestingly binding of these factors to the SCD1 promoter was heavily modified upon the shift from 2D to 3D cultures. In order to identify the Transcription Factors that assume importance directly or indirectly in CSCs, gene silencing was performed to evaluate whether the inhibition of activity could be reflected on the expression of SCD1. Indeed, the regulation of SCD1 in lung CSCs is influenced by SREPB1 and NF-Y. Considering the result obtained, the next objective was to perform mutagenesis on the SCD1 promoter, using CRISPR/Cas9 system to obtain stable clones that identify the promoter portion in the SCD1 transcriptional regulation in CSCs. The characterization of the clone PR\_1 $\Delta$  show a decrease in the SCD1 expression and reduce of the Sphere forming assay, since the mutagenesis of portion which the binding sites of SREPB1, and c-MYC and NF-kB. In the future, will be investigate the analysis of functional genomics on the transcriptome and of chromatin accessibility, both in relation to the SCD1 promoter and in CSCs. The information that will result will allow us to strengthen information and therapies towards lung adenocarcinoma.

## SOMMARIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RIASSUNTO</b>  | <b>2</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>5</b>  |
| <b>1 INTRODUZIONE</b>   | <b>10</b> |
| <b>1.1 La teoria delle Cellule Staminali Tumorali</b>                       | <b>10</b> |
| 1.1.1 Meccanismi di resistenza e CSCs                                       | 13        |
| 1.1.2 Metabolismo e cancro  | 14        |
| <b>1.2 Espressione e ruolo dell'enzima Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD-1)</b>  | <b>16</b> |
| 1.2.1 SCD1 e biosintesi lipidica delle cellule tumorali polmonari           | 17        |
| 1.2.2 SCD1: regolatore dei processi alla base della carcinogenesi           | 20        |
| 1.2.3 Versamenti pleurici come modello di studio del carcinoma polmonare    | 22        |
| 1.2.4 SCD1: regolatore della sopravvivenza di cellule staminali tumorali    | 23        |
| 1.2.5 L'inibizione di SCD1 reverte la resistenza al CDDP in CSCs di polmone | 25        |
| <b>1.3 Hippo pathway: ruolo di YAP e TAZ nel cancro</b>                     | <b>27</b> |
| <b>1.4 Fattori trascrizionali coinvolti nella regolazione di SCD1</b>       | <b>31</b> |
| 1.4.1 Sterol Regulatory Element Binding Proteins (SREPB)                    | 32        |
| 1.4.2 MYC   | 34        |
| 1.4.3 Nuclear Factor-Y (NF-Y)   | 36        |
| 1.4.4 Nuclear Factor (NF)-kB  | 37        |
| 1.4.5 Modificazione degli istoni  | 38        |
| <b>1.5 Sistema CRISPR / Cas9</b>  | <b>39</b> |
| 1.5.1 Il sistema CRISPR/Cas: meccanismo di azione                           | 40        |
| 1.5.2 Applicazioni della tecnologia CRISPR                                  | 43        |
| 1.5.3 CRISPR/Cas9: limiti e problemi  | 45        |
| <b>2 SCOPO DEL LAVORO</b>   | <b>47</b> |
| <b>2.1 Background</b>   | <b>47</b> |
| <b>2.2 Scopo del lavoro (I° parte)</b>                                      | <b>48</b> |
| <b>2.3 Scopo del lavoro (II° parte)</b>                                     | <b>49</b> |
| <b>3 MATERIALI E METODI</b>   | <b>50</b> |
| <b>3.1 Colture Cellulari</b>  | <b>50</b> |
| 3.1.1 Linee cellulari primarie da versamento pleurico                       | 50        |
| 3.1.2 Linee cellulari stabili   | 50        |
| 3.1.3 Linee cellulari in coltura in 3D                                      | 50        |
| <b>3.2 Saggi di vitalità e trattamenti farmacologici</b>                    | <b>51</b> |
| <b>3.3 La Citofluorimetria (FACS analysis)</b>                              | <b>52</b> |
| <b>3.4 Tecniche di Immunochimica</b>  | <b>52</b> |
| 3.4.1 Il Western Blot (WB)  | 52        |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 3.4.2       | Immunofluorescenza (IF)  | 53        |
| 3.4.3       | Immunoistochimica (IHC)  | 53        |
| <b>3.5</b>  | <b>Metodi di analisi dell'RNA</b>  | <b>54</b> |
| 3.5.1       | Estrazione di RNA e Real Time quantitative PCR (RT-PCR)  | 54        |
| <b>3.6</b>  | <b>Trasfezioni per silenziamento genico</b>  | <b>54</b> |
| <b>3.7</b>  | <b>Analisi degli ACIDI GRASSI (FAMES)</b>  | <b>55</b> |
| <b>3.8</b>  | <b>Microscopia confocale e elettronica</b>   | <b>55</b> |
| <b>3.9</b>  | <b>Saggi per lo studio delle interazione tra DNA e proteine</b>  | <b>55</b> |
| 3.9.1       | Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)  | 55        |
| 3.9.2       | Quantitative Real Time PCR (RT-qPCR)   | 56        |
| <b>3.10</b> | <b>Costruzione del vettore pSpCas9-sgRNA</b>   | <b>57</b> |
| 3.10.1      | Trasfezione dei mutanti nella linea stabile di adenocarcinoma del polmone  | 59        |
| 3.10.2      | Screening delle colonie e verifica della mutagenesi  | 59        |
| <b>3.11</b> | <b>Analisi genomica funzionale</b>   | <b>59</b> |
| 3.11.1      | ATAC-seq   | 59        |
| 3.11.2      | RNA-seq  | 60        |
| 3.11.3      | Analisi bioinformatica   | 60        |
| <b>3.12</b> | <b>Analisi bioinformatica</b>  | <b>60</b> |
| <b>3.13</b> | <b>Analisi statistica</b>  | <b>61</b> |
| <b>3.14</b> | <b>Anticorpi</b>   | <b>61</b> |
| 3.14.1      | Anticorpo per Immunoblot, IF e IHC   | 61        |
| 3.14.2      | Anticorpi per ChIP   | 62        |
| <b>3.15</b> | <b>Oligonucleotidi</b>   | <b>62</b> |
| <b>3.16</b> | <b>Reagenti e plasmidi</b>   | <b>64</b> |
| <b>4</b>    | <b>RISULTATI PARTE I°</b>  | <b>65</b> |
| 4.1         | Espressione e localizzazione di YAP e TAZ in CSCs del polmone  | 65        |
| 4.2         | SCD1 regola l'espressione e l'attività di YAP/TAZ nelle cellule 3D di polmone  | 67        |
| 4.3         | L'inibizione SCD1 cambia l'ultrastruttura cellulare e il profilo degli acidi grassi nelle cellule 3D di adenocarcinoma del polmone                 | 69        |
| 4.4         | SCD1 regola l'attività di YAP/TAZ in CSCs di polmone mediante la modulazione del pathway di $\beta$ -catenina                                      | 70        |
| 4.5         | L'espressione di SCD1, YAP/TAZ, $\beta$ -Catenina correlano negativamente con la sopravvivenza di pazienti affetti da l'adenocarcinoma del polmone | 74        |
| <b>5</b>    | <b>Conclusione</b>   | <b>77</b> |
| 5.1         | Parte I°   | 77        |
|             | <b>Risultati PARTE II°</b>   | <b>80</b> |
| 5.2         | Studio dell'espressione di SCD1 in linee stabili di adenocarcinoma del polmone   | 80        |
| 5.3         | Caratterizzazione della regione del promotore di SCD1  | 81        |



|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 5.3.1      | Analisi bionformatica   | 81         |
| 5.3.2      | Analisi dei siti di legame dei Fattori Trascrizionali sul promotore di SCD1   | 82         |
| 5.3.3      | Il silenziamento genico dei Fattori Trascrizionali modula l'espressione di SCD1 in cellule 2D di adenocarcinoma del polmone | 85         |
| 5.3.4      | Il silenziamento genico dei Fattori Trascrizionali modula l'espressione di SCD1 in cellule 3D di adenocarcinoma del polmone | 86         |
| <b>5.4</b> | <b>Mutagenesi del promotore di SCD1 mediante il sistema CRISPR/Cas9</b>   | <b>88</b>  |
| 5.4.1      | Generazione vettori contenenti sgRNA e dei cloni  | 88         |
| 5.4.2      | Caratterizzazione del clone PR_1Δ ottenuto da pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA1 + pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA2                     | 90         |
| 5.4.3      | Caratterizzazione del clone PR_2Δ ottenuto da pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA2 + pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA3                     | 93         |
| <b>6</b>   | <b>Conclusione Parte II°</b>  | <b>96</b>  |
| 6.1        | Prospettive future: analisi genomica funzionale   | 98         |
| <b>7</b>   | <b>Bibliografia</b>   | <b>101</b> |
| <b>8</b>   | <b>Elenco Pubblicazioni</b>   | <b>118</b> |

# 1 INTRODUZIONE

Da sempre lo studio della tumorigenesi si è focalizzato sull'insorgenza e la progressione neoplastica, dipendenti dall'acquisizione di varie mutazioni che attivano *pathways* oncogenici ed inattivano soppressori tumorali. L'evoluzione clonale di queste cellule genera un'eterogeneità all'interno della massa tumorale con coesistenza di popolazioni cellulari che differiscono nelle loro caratteristiche genetiche, fenotipiche e funzionali. Tuttavia, a questa visione gene-centrica, recenti studi condotti su quelle che vengono definite Cellule Staminali Tumorali (CSCs) hanno accostato l'ipotesi che quest'ultime siano la base dell'eterogeneità e della progressione tumorale.

## 1.1 La teoria delle Cellule Staminali Tumorali

La teoria delle CSCs sostiene l'esistenza di una sottopopolazione di cellule neoplastiche all'interno del tumore con caratteristiche simil staminali, in grado di originare e promuovere la progressione tumorale (Eramo, Haas, & De Maria, 2010; Pattabiraman & Weinberg, 2014). Le Cellule Staminali (SCs) hanno la capacità di autorinnovarsi in maniera indefinita e di generare cellule mature, funzionalmente specializzate, attraverso il differenziamento (Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001). Rispetto al potenziale differenziativo le SCs si possono suddividere in: totipotenti, pluripotenti, multipotenti ed unipotenti. Il numero di SCs all'interno di un dato tessuto è limitato, ed il loro stato funzionale dipende dalla presenza di un microambiente o nicchia staminale che regola l'equilibrio tra autorinnovamento e differenziamento. Gli stimoli ambientali possono indurre le SCs a generare cellule progenitrici che entrano in uno stato proliferativo attivo. Una divisione asimmetrica porta alla generazione di due cellule figlie di cui una rimane nella nicchia staminale e mantiene le stesse proprietà della cellula madre, mantenendo il *pool* di SCs all'interno del tessuto; mentre l'altra è rimossa dalla nicchia generando una cellula progenitrice, dotata di un minor potenziale differenziativo con maggior capacità replicativa rispetto alla cellula madre. Le cellule progenitrici proliferano intensamente e differenziano perdendo la loro capacità di autorinnovamento, dando origine a cellule mature di un determinato organo o tessuto e garantendo la rigenerazione in caso di danno (Clarke & Becker, 2006; Mancini et al., 2018; Plaks, Kong, & Werb, 2015).

Allo stato attuale vi sono due modelli che cercano di rappresentare l'origine della progressione tumorale, l'uno basato su un approccio stocastico, l'altro invece di matrice gerarchica (Marusyk, Almendro, & Polyak, 2012). Il modello stocastico assegna a tutte le cellule all'interno di un tessuto uguale probabilità di sviluppare la neoplasia e facilitare la progressione tumorale; spiegando l'eterogeneità tumorale mediante l'accumulo progressivo di mutazioni oncogeniche in cellule che, avendo un vantaggio proliferativo, sono oggetto di espansione clonale. Secondo il modello gerarchico, invece, l'eterogeneità tumorale non è funzione del potenziale differenziativo, quanto di una gerarchia all'interno del tessuto avente all'apice le SCs, mentre l'originarsi ed il progredire del tumore viene spiegato tramite mutazioni in cellule staminali o progenitrici che portano alla formazione di CSCs. La messa a sistema della carcinogenesi con le capacità di autorinnovamento e divisione asimmetrica proprie della staminalità, va a creare il cuore della massa tumorale altamente indifferenziato e cellule progenitrici differenziate ma fortemente proliferanti.

A seconda del potenziale differenziativo della SC iniziante il tumore, si avranno diverse sottopopolazioni tumorali che renderanno conto dell'eterogeneità (Marusyk et al., 2012; Plaks et al., 2015). I due modelli possono non essere considerati mutualmente esclusivi, per cui mutazioni che inducono una riprogrammazione epigenetica permettono alle cellule tumorali differenziate di revertire allo stato di cellule progenitrici, accordando i due sistemi (Clevers, 2011; Marusyk et al., 2012; Plaks et al., 2015) (Figura 1).

Poiché il cancro può essere considerato una patologia dovuta ad una deregolazione del processo proliferativo, è ragionevole pensare che un'alterazione dei meccanismi che normalmente controllano l'autorinnovamento nelle cellule staminali, porti alla generazione di nuove cellule cancerose (Jordan, Guzman, & Noble, 2006; Reya et al., 2001). In accordo con questa teoria, è importante sottolineare che le molteplici vie di *signaling* alterate nei processi tumorigenici sono le stesse che regolano l'autorinnovamento delle SCs. Infatti, è plausibile pensare che le CSCs si generino da mutazioni che intervengono in SCs normali (Medema, 2013; O'Brien, Kreso, & Jamieson, 2010; Reya et al., 2001). La trasformazione di SCs in CSCs assume quindi, due possibili declinazioni: la deregolazione di *pathways* di Notch o di Sonic Hedgehog (Shh) o il *pathway* di *Wnt*/β-catenina, oppure le mutazioni che intervengono nelle cellule

progenitrici, le *"transit-amplifying cells"* che assumono una forte connotazione replicativa, perdendo la capacità di autorinnovamento propria delle SCs (Bjerkvig, Tysnes, Aboody, Najbauer, & Terzis, 2005; Huntly & Gilliland, 2005).

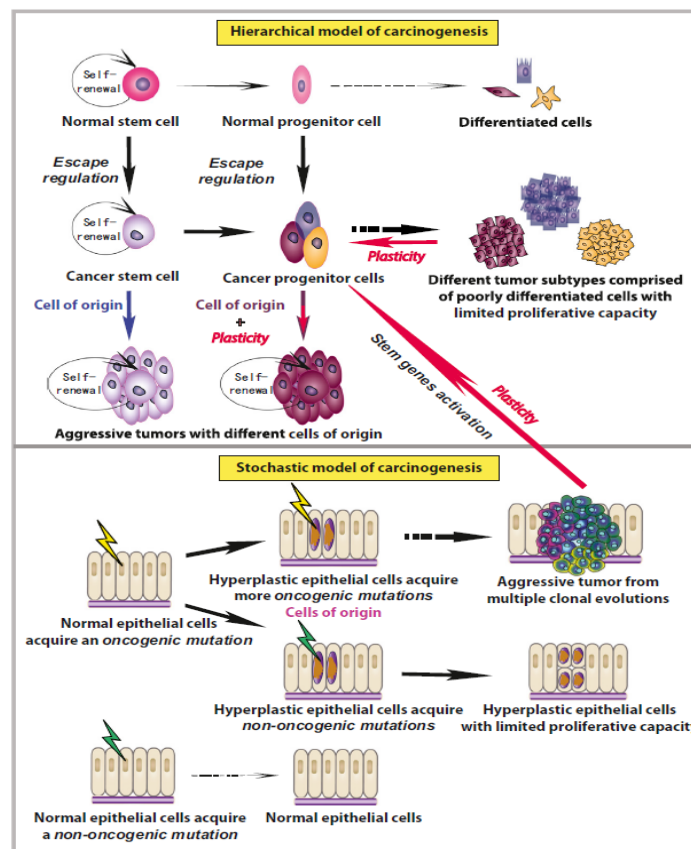


Figura 1. Modello gerarchico e modello stocastico. Rappresentazione grafica alla base della carcinogenesi (Plaks et al., 2015).

Inoltre, affinché si generino CSCs a partire dalle cellule progenitrici è necessario che l'interferenza delle mutazioni permetta di riacquistare la capacità di autorinnovamento in maniera indefinita. Le proprietà intrinseche delle CSCs offrono una spiegazione sia riguardo l'eterogeneità tumorale, che all'insorgere di resistenze alle terapie convenzionali (Eramo et al., 2010; Jordan et al., 2006).

Nella traslazione alla pratica di laboratorio, le CSCs nascondono aspetti critici da un punto di vista applicativo che, malgrado gli studi per l'isolamento delle CSCs dal tumore primitivo abbiano fatto notevoli progressi, pongono notevoli limitazioni. In primo luogo la porzione della neoplasia, da cui è possibile allestire le culture primarie è generalmente piccola e solamente in pochi casi le cellule sono in grado di attecchire *in vivo*. Inoltre, data la complessità delle interazioni coinvolte nel metabolismo delle CSCs, è prassi che negli studi *in vivo* in modelli murini non sia possibile replicare il microambiente tumorale umano (Eramo et al., 2008;

Han, Shi, Gong, Zhang, & Sun, 2013; Kreso & Dick, 2014). Per ovviare a tali limitazioni, i nuovi approcci metodologici consentono di ampliare le conoscenze sul carcinoma polmonare utilizzando i versamenti pleurici maligni (Malignant Pleural Effusion, MPEs) come fonte di materiale da cui isolare e amplificare le CSCs (Mancini et al., 2011).

### **1.1.1 Meccanismi di resistenza e CSCs**

Come già accennato, le CSCs sono in generale un appetibile ma difficile bersaglio terapeutico. Ciò è principalmente dovuto alle intrinseche proprietà di staminalità: autorinnovamento e scarsa differenziazione sono quindi i principali imputati della resistenza ai farmaci e della recidiva (Housman et al., 2014). Gli agenti antineoplastici convenzionali agiscono tramite due meccanismi principali: effetto citotossico che induce danno al DNA, ed effetto citostatico che altera i processi mitotici e di replicazione del DNA. Per la cura contro il carcinoma del polmone non a piccole cellule (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC) la chemioterapia convenzionale utilizza il cis-diamminodichloroplatino o Cisplatino (CDDP) che causa sia effetti citotossici mediati dalle interazioni con il DNA, sia dalla formazioni di addotti di DNA che attivano le vie di trasduzione del segnale e apoptosi (M.P. Barr & O'Byrne, 2013; Martin P. Barr et al., 2013; Eramo et al., 2010; Lopez-Ayllon et al., 2014). I meccanismi responsabili della resistenza al CDDP delle cellule tumorali coinvolgono un insieme di processi che possono indurre un decremento dell'accumulo intracellulare, o un incremento dell'efflusso extracellulare del farmaco. L'insieme dei meccanismi di detossicazione cellulare, delle alterazioni di trasduzione del segnale, dell'aumento dell'efficienza di riparazione del DNA, contribuiscono allo sviluppo della resistenza al CDDP da parte dei tumori (Prieto-Vila, Takahashi, Usuba, Kohama, & Ochiya, 2017). Nonostante vari tentativi per creare nuove molecole a scopo terapeutico, non è possibile aumentare la sopravvivenza media a causa della comparsa della chemio-resistenza. Alcuni studi cercano di creare modelli atti a migliorare la comprensione dei meccanismi molecolari alla base del fenotipo resistente al CDDP. L'identificazione delle CSCs potrebbe rappresentare il miglior target terapeutico per eradicare completamente il tumore (Eramo et al., 2010).

Sono stati individuati diversi meccanismi molecolari coinvolti in questo processo in particolare l'*over*-espressione di: proteine di efflusso (trasportatori ABC), glicoproteina P (P-gp, glicoproteina di permeabilità), proteina associata alla

resistenza al cancro alla mammella (BCRP) e proteina di resistenza multi-farmaco (MRP) (Donnenberg, Meyer, & Donnenberg, 2009; Vinogradov & Wei, 2012). In altri casi, la resistenza sembra essere garantita dall'abilità delle CSCs di sopravvivere in condizioni di stress, correlata alla protezione dell'integrità genomica attraverso un'attivazione rapida dei sensori di danno al DNA e dei meccanismi di riparo. Gli studi sulla resistenza dei tumori sono ancora limitati perché, le putative CSCs sono presenti in minime quantità nel tessuto tumorale, proliferano lentamente e spesso la quantità di tessuto tumorale a disposizione è insufficiente. Questo fenomeno viene in parte spiegato dal fatto che le CSCs, rimangono in uno stato indifferenziato e quiescente, e di conseguenza sfuggono all'azione dei chemioterapici che svolgono la loro attività citotossica su cellule in attiva proliferazione (Maugeri-Saccà, Bartucci, & De Maria, 2012; Shiina & Bourguignon, 2015).

### **1.1.2 Metabolismo e cancro**

Una delle più comuni caratteristiche del cancro è la modificazione radicale del metabolismo cellulare in grado di promuovere e sostenere le tappe peculiari della trasformazione maligna, ossia una costante proliferazione, l'aumento della resistenza alla morte programmata e la capacità di metastatizzare organi a distanza. Nelle cellule tumorali, l'alterazione del programma metabolico è innescata dall'attivazione di reazioni biosintetiche atte a sostenere una rapida divisione delle cellule tumorali attraverso molecole strutturali, energetiche e di segnale, necessarie per la generazione di cellule simili. La prima alterazione metabolica largamente caratterizzata nel tumore è l'effetto di Warburg, secondo cui la produzione di Adenosina Trifosfato (ATP) non si ottiene dalla fosforilazione ossidativa ma attraverso la glicolisi aerobica, anche in concentrazioni normali di ossigeno. Di conseguenza, a differenza della maggior parte delle cellule normali, le cellule trasformate ottengono l'energia dalla glicolisi aerobica, convertendo molto più glucosio entrante in lattato rispetto a quello metabolizzato attraverso la fosforilazione ossidativa (Ferreira, 2010; Heiden, Cantley, & Thompson, 2009; P. P. Hsu & Sabatini, 2008; Liberti & Locasale, 2016).

La glicolisi aerobica è più rapida della fosforilazione ossidativa, ma meno efficiente in termini di ATP generato per unità di glucosio consumato. Questo cambiamento richiede che le cellule tumorali incrementino sensibilmente il tasso di assorbimento di glucosio per soddisfare il loro aumentato bisogno di energia,

di attività di biosintesi e di reazioni redox. Per auto-mantenersi, il tumore altera il metabolismo del glucosio e lo potenzia, utilizzando la glicolisi aerobica come via preferenziale da cui ottenere energia. Tuttavia, per sopperire all'elevata richiesta energetica, le cellule tumorali con un catabolismo del glucosio aumentato, sostengono anche un maggior apporto della glutammina. La glutammina rappresenta la principale fonte di azoto richiesto per la biosintesi delle basi azotate, degli amminoacidi non essenziali e per sostenere la via delle esosammine (Pavlova & Thompson, 2016; J. Zhang, Pavlova, & Thompson, 2017). In aggiunta al metabolismo di glucosio e glutammina, un'altra caratteristica fondamentale nell'alterazione metabolica delle cellule cancerose è stata individuata in un aumento della sintesi lipidica.

L'aumento della lipogenesi, ed in particolare della sintesi degli acidi grassi, sembra essere un evento alla base della trasformazione neoplastica contribuendo alla produzione di fosfolipidi, necessari per la continua produzione di membrane biologiche, di trigliceridi ed esteri del colesterolo, immagazzinati in quelli che vengono definiti "*lipid droplets*" (*LDs*), per la produzione di energia necessaria a sostenere la crescita e la proliferazione (Menendez, J.A. et al., 2007). I *LDs* sono organelli intracellulari che originano dalla membrana plasmatica e rappresentano siti di accumulo dei lipidi neutri, formati per prevenire la lipotossicità in casi di eccesso di acidi grassi saturi (C. W. Wang, 2016). Recenti studi dimostrano che la biosintesi dei lipidi rappresenta il requisito fondamentale per la sopravvivenza delle membrane delle cellule tumorali in divisione. L'attivazione della biosintesi dei lipidi, soprattutto la sintesi *de novo* degli acidi grassi, sembra essere il principale evento della trasformazione metabolica che determina l'insorgenza del cancro (Igal, 2010; Röhrig & Schulze, 2016). I principali costituenti delle membrane, fosfolipidi, diacilgliceroli, triacilgliceroli ed esteri del colesterolo, derivano degli acidi grassi saturi (*SFA*) e monoinsaturi (*MUFA*).

Un regolatore chiave nella composizione in acidi grassi dei lipidi cellulari è rappresentato dalla famiglia delle *Stearoyl-CoA Desaturasi* (*SCD*), conosciuto anche come *fatty acyl-CoA delta-9 desaturases* (Mancini et al., 2018). In letteratura, diversi studi attribuiscono il ruolo chiave dell'enzima nei processi oncogenici, indicando la *Stearoyl-CoA Desaturasi 1* (*SCD1*) il nuovo bersaglio molecolare per future terapie antitumorali (Currie, Schulze, Zechner, Walther, & Farese, 2013; Flavin, Peluso, Nguyen, & Loda, 2010; H.-J. Kim, Miyazaki, &

Ntambi, 2002; Mancini et al., 2018; Mason et al., 2012; Roongta et al., 2011; Scaglia & Igal, 2005).

## 1.2 Espressione e ruolo dell'enzima Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD-1)

SCD è un enzima appartenente alla famiglia delle  $\Delta$ -9-acil-CoA desaturasi localizzati sulla membrana del reticolo endoplasmico, che catalizzano la biosintesi dei *MUFA* impiegando come substrati gli *SFA* introdotti attraverso la dieta o sintetizzati *de novo*. Nell'uomo sono espresse due isoforme: SCD1 e SCD5 che mostrano a livello tissutale un profilo di distribuzione differente. SCD1 risulta essere una proteina ubiquitaria particolarmente espressa nel tessuto adiposo e nel fegato, in risposta ad una dieta ad elevato contenuto di carboidrati; mentre SCD5 viene espressa limitatamente nel pancreas e nel cervello (Castro et al., 2011; Miyazaki et al., 2004; Roongta et al., 2011; X. Wu et al., 2013). SCD1 catalizza l'introduzione di un doppio legame tra il carbonio 9 e il carbonio 10 di diversi acidi grassi saturi come quello palmitico (16:0) e quello stearico (18:0) per costituire rispettivamente l'acido palmitoleico (16:1) ed oleico (18:1) (Ralston, Matravadia, Gaudio, Holloway, & Mutch, 2015) (Figura 2).

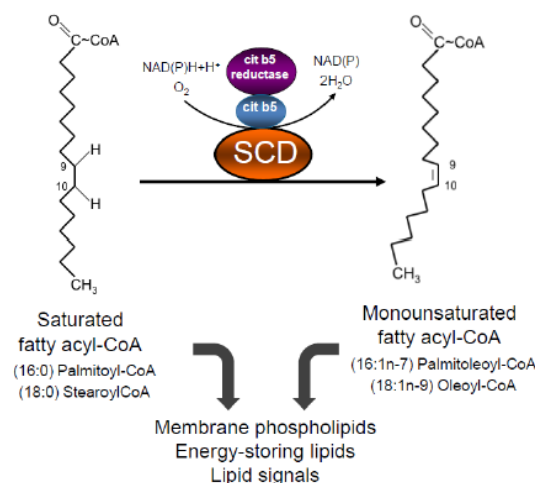


Figura 2. Schematizzazione della reazione di desaturazione di SCD1 degli acidi grassi saturi in acidi grassi insaturi (Igal, 2016).

I livelli di SCD1 nelle cellule di mammifero sono determinati dalla regolazione a livello trascrizionale del gene. Il promotore del gene che codifica SCD1 è stato caratterizzato in diversi vertebrati, compreso l'uomo (Mauvoisin, Charfi, Lounis, Rassart, & Mounier, 2013).



Sono state identificate una serie di fattori di trascrizione che legano il promotore di SCD1: recettore nucleare *LXR* (*Liver X Receptor*), *SREBP 1c* (*Sterol Response Element Binding Protein 1c*), *ChREBP* (*Carbohydrate Response Element Binding Protein*), *PPAR* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) ed il recettore per gli ormoni estrogeni (Flowers & Ntambi, 2008; Miyazaki et al., 2007; Paton & Ntambi, 2010). In generale l'espressione dei geni di SCD viene regolata dai livelli di *PUFA* e di colesterolo, attraverso due meccanismi indipendenti. Il principale regolatore di SCD1 è *SREBP* e la cui maturazione, in condizioni normali, viene mediata dall'azione di *SCAP* (*SREBP cleavage-activating protein*) che ne consente la traslocazione dal reticolo endoplasmico al nucleo. Nel nucleo *SREBP* lega le *SREs* (*Sterol Regulatory Elements Binding Protein*) avviando la trascrizione dei geni SCD. In presenza di *PUFA* e colesterolo la maturazione di *SREBP* mediata da *SCAP* viene repressa, impedendo a valle la trascrizione dei geni SCD. In maniera indipendente, i *PUFA* provenienti dalla dieta o dai fosfolipidi di membrana (mPL) legano le putative *PUFA binding protein* (*PUFA-BP*), formando il complesso *PUFA/PUFA-BP*. Tale complesso, attraverso il legame con le *PUFA-RE* (*polyunsaturated fatty acid response element*), è in grado di reprimere direttamente la trascrizione dei geni SCD (Mansara, Deshpande, Vaidya, & Kaul-Ghanekar, 2015; Wortman et al., 2009). In presenza di stimoli attivatori la trascrizione del gene SCD1 comporta la produzione dei *MUFA* più abbondanti sia nelle cellule sia normali che tumorali, rappresentati dall'acido oleico e palmitoleico. L'attività degli enzimi SCD risulta avere ampi effetti sulla fisiologia della membrana cellulare, sull'immagazzinamento energetico e sulla segnalazione cellulare (Bhagat & Das, 2015; Roongta et al., 2011). L'attività di SCD1 viene coinvolta nella patogenesi di numerose malattie associate ad un'alterazione del metabolismo lipidico; in particolare, l'espressione di elevati livelli dell'enzima viene riscontrato nell'obesità, nell'insulino-resistenza, nell'aterosclerosi e nei carcinomi di polmone, mammella, ovaio, colon e prostata (J. Li et al., 2017; Mancini et al., 2018; James M. Ntambi & Miyazaki, 2004).

### **1.2.1 SCD1 e biosintesi lipidica delle cellule tumorali polmonari**

Le cellule cancerose mostrano un aumento della sintesi *de novo* degli acidi grassi, sostenuta sia dagli intermedi prodotti dalla glicolisi, sia da un aumento di espressione degli enzimi coinvolti nella lipogenesi (Igal, 2010). La sintesi degli

acidi grassi è un processo che avviene nel citoplasma e richiede come substrato l'acetil-CoA, generato all'interno del mitocondrio da parte del piruvato, la reazione è catalizzata dall'enzima piruvato deidrogenasi che dirige il flusso glicolitico nel ciclo dell'acido citrico. Il citrato prodotto attraverso questo ciclo metabolico è trasportato dal mitocondrio al citosol, dove è nuovamente convertito in acetil-CoA dall'enzima ACLY (*adenosine triphosphate-citrate lyase*).

La conversione dell'acetil-CoA in malonil-CoA avviene per opera dell'enzima ACC (*acetyl-CoA carboxylase*), e, al fine di formare acidi grassi a catena lunga, l'enzima FASN (*fatty -acid synthase*) catalizza la reazione di condensazione con una molecola di acetil-CoA. A loro volta, gli acidi grassi saturi sono attivati dall'enzima ACSL (*long chain fatty acyl-CoA synthetase*) con aggiunta di acetil-CoA, che fungono da substrati per la desaturazione operata da SCD1 e la sintesi di fosfolipidi e trigliceridi.

SCD1 non solo regola la composizione degli acidi grassi all'interno della cellula, ma agisce anche come regolatore della lipogenesi. Infatti, in cellule di adenocarcinoma del polmone, in cui l'espressione del gene SCD1 è stata stabilmente ridotta, mostrano una diminuzione della produzione di acidi grassi, trigliceridi, esteri del colesterolo e fosfolipidi (Scaglia et al., 2008). Risultati simili sono stati ottenuti in cellule cancerose in cui l'attività di SCD1 è stata inibita farmacologicamente, a dimostrazione del fatto che, SCD1 controlla complessivamente il processo di sintesi lipidica nelle cellule cancerose. Sono stati proposti diversi meccanismi attraverso i quali SCD1 sembra regolare la sintesi ed il riciclo dei lipidi nelle cellule cancerose (Scaglia et al., 2009). Un primo meccanismo consiste nella modulazione dell'attività catalitica dell'enzima ACC implicato nella via biosintetica, come descritto in precedenza.

Il controllo viene operato dagli acidi grassi saturi, nella loro forma attiva, che fungono da inibitori allosterici dell'enzima ACC, promuovendo la sua depolimerizzazione tramite un meccanismo a feedback negativo che tende a favorire la sintesi degli acidi grassi. Nelle cellule cancerose l'elevata presenza di SCD1 porta ad una riduzione dei livelli di SFA che vengono convertiti in MUFA, prevenendo quindi l'inibizione di ACC e mantenendo attiva la via biosintetica (Igal RA, 2016) (Figura 3).

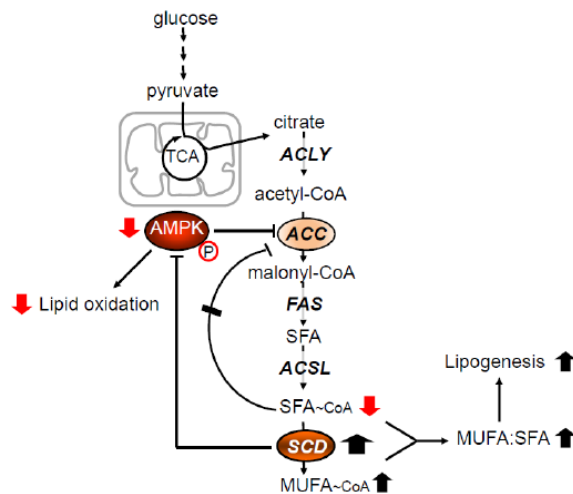


Figura 3. Regolazione del metabolismo lipidico operata da SCD1 nelle cellule cancerose (Igal, 2016).

Nelle cellule cancerose, l'elevata attività di SCD1, può portare ad un'alterazione del bilancio tra processo anabolico (sintesi degli acidi grassi) e catabolico ( $\beta$ -ossidazione), a favore della sintesi degli acidi grassi, attraverso l'azione inibitoria esercitata sull'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Figura 3). In cellule di carcinoma del polmone è stato osservato che l'inibizione di SCD1 induce l'attivazione di AMPK con conseguente fosforilazione ed inattivazione dell' ACC (Scaglia & Igal, 2005).

Tuttavia il meccanismo molecolare attraverso cui SCD1 è in grado di inibire l'attività di AMPK, mantenendo attiva la sintesi degli acidi grassi a discapito della loro ossidazione, non è stato ancora determinato (Hess, Chisholm, & Igal, 2010; Igal, 2016). In aggiunta all'azione esercitata sull'ACC e AMPK, SCD1 è in grado di modulare la sintesi lipidica attraverso la regolazione di SREBPs, in particolare delle isoforme SREBP-1a e SREBP-1c, che sono i principali regolatori degli enzimi coinvolti nel *pathway*. Sebbene alcuni studi mostrano come *MUFA* esogeni hanno un effetto inibitorio sull'attività di SREBP-1, altri studi evidenziano come i *MUFA* prodotti dall'attività di SCD1 siano critici per la produzione di SREBP-1 trascrizionalmente attivo (Miyazaki et al., 2007).

Dunque, è plausibile pensare che l'over-espressione di SCD1 indotta da SREBP-1 nelle cellule cancerose promuova a livello delle membrane una diminuzione del contenuto di *SFA* ed un aumento di *MUFA*, favorendo l'attivazione di SREBP-1. La presenza di questo potenziale meccanismo a *feedforward* tra SCD1 e SREBP-1 nelle cellule tumorali potrebbe essere, almeno in parte, responsabile dell'elevato tasso di sintesi lipidica (Igal, 2016).

### 1.2.2 SCD1: regolatore dei processi alla base della carcinogenesi

Dalla letteratura specialistica si evince che l'elevata espressione ed attività di SCD1 e di conseguenza di *MUFA* rappresentano una caratteristica distintiva delle cellule cancerose. Dati clinici ed epidemiologici indicano la presenza di uno sbilanciamento nei livelli di *SFA* e *MUFA* nel sangue e nei tessuti di pazienti affetti da diversi tipi di cancro, incluso quello ai polmoni, alla mammella, al fegato, alla prostata, al colon ed alla tiroide, ad indicare che un'elevata attività di SCD1 ha un ruolo fondamentale nell'insorgenza e nella progressione di questo tipo di patologia. Nelle cellule cancerose l'incremento di SCD1 induce l'aumento della conversione di *SFA* in *MUFA*, che innesca la stimolazione dei processi biologici atti a incrementare il tasso di crescita e proliferazione, una maggiore motilità cellulare ed invasività, tende ad inibire sia lo stress cellulare che l'apoptosi ed il differenziamento, tutti processi alla base della carcinogenesi. Queste evidenze sottolineano il ruolo di SCD1 come regolatore chiave del fenotipo tumorale (Igal, 2016) (Figura 4).

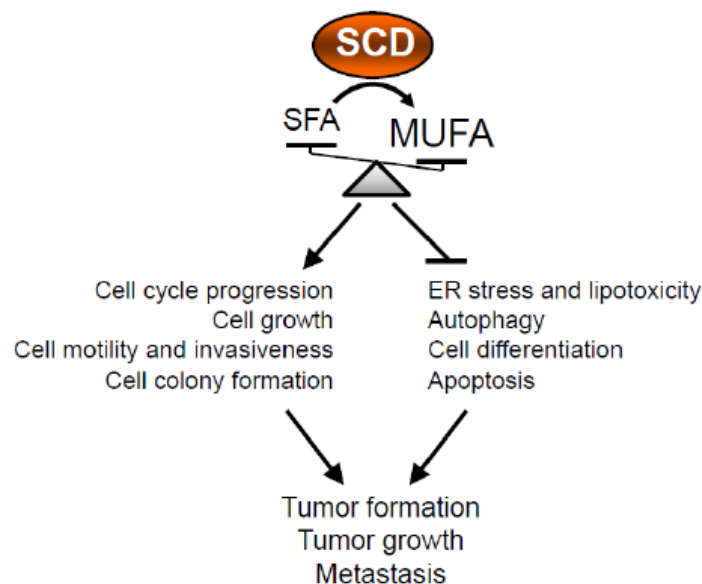


Figura 4. SCD1 è un regolatore chiave dei meccanismi alla base della carcinogenesi (Igal, 2016).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'attività di SCD1, come quella degli enzimi *FAS* e *ACC*, controlla il tasso di replicazione nelle cellule cancerose modulando specifici eventi nella progressione del ciclo cellulare, in particolare il passaggio dalla fase G1 alla fase S. Ciò implica che la sintesi di *SFA* e la conversione in *MUFA* debba essere coordinata per l'ingresso nella fase di sintesi del ciclo cellulare, momento in cui gli acidi grassi sono abbondantemente richiesti per la

produzione di nuove membrane cellulari (Fritz et al., 2010; Hess et al., 2010). Sebbene siano poco conosciuti i meccanismi molecolari attraverso cui SCD1 influenza il ciclo cellulare, dati sperimentali indicano che l'enzima interviene modulando i livelli della ciclina D1 e della CDK6, proteine coinvolte nella progressione delle cellule attraverso transizione G1/S (Hess et al., 2010).

A tal proposito, è stato osservato che l'inibizione di SCD1 in cellule di tumore alla mammella porta alla defosforilazione e attivazione della chinasi GSK3  $\beta$  (*glycogen synthase-kinase  $\beta$* ), un target a valle della via di segnalazione di Akt e componente essenziale del complesso di degradazione di  $\beta$ -catenina ( *$\beta$ -catenin destruction complex*). Questa chinasi quando è attiva, fosforila la  $\beta$ -catenina mediandone la degradazione attraverso il proteosoma, con concomitante diminuzione della localizzazione nucleare e dell'espressione dei suoi geni target, tra cui la ciclina D1 e vimentina, modulatori cruciali della progressione del ciclo cellulare e nella transizione epitelio-mesenchima (EMT) (Mauvoisin et al., 2013). È stato dimostrato che l'elevata presenza di MUFA nelle cellule cancerose regola il *pathway* di Wnt/ $\beta$ -catenina sia indirettamente, che attraverso la diretta modificazione post-traduzionale della proteina Wnt.

Recentemente è stato dimostrato come l'attività di SCD1 sia richiesta per la produzione di MUFA-CoA, substrato dell'aciltransferasi MBOAT (*membrane-bound O-acyltransferase*) appartenente alla famiglia degli enzimi *porcupine*, che catalizza l'aggiunta di un gruppo palmitoleico sulla serina in posizione 209 di Wnt3A, e in che modo l'inibizione di SCD1 impedisca la secrezione di Wnt3A e l'attivazione del *pathway* (Noto et al., 2017; Rios-Esteves, Haugen, & Resh, 2014). Questa modifica post-traduzionale è essenziale per la secrezione di Wnt3A che, interagendo con il suo recettore Frizzled (FDZ), permette l'attivazione della via di segnalazione (Inoue et al., 2006; Janda et al., 2017). Queste evidenze rafforzano l'idea che SCD1 sia un regolatore dei processi di proliferazione e metastatizzazione delle vie di segnalazione legate alla sopravvivenza cellulare (Igal, 2016).

Alcuni studi sostengono che la localizzazione e l'attivazione del recettore EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) sia strettamente correlata alla struttura ed alla composizione della membrana plasmatica, ove è stata evidenziata la presenza di particolari regioni lipidiche, denominate *lipid raft* o "zattere" lipidiche, ricche in colesterolo, sfingolipidi e fosfolipidi saturi. Queste regioni sono microdomini funzionali importanti per la fluidità della membrana, per l'attivazione

dei recettori tirosin-chinasici e dei loro effettori a valle (Pike, 2009; Pike, Han, & Gross, 2005). In particolare, in assenza di stimolazione il recettore *EGFR* è localizzato nei *lipid raft*, mentre la sua attivazione comporta la migrazione della proteina da una regione lipidica *raft-like* verso i domini *non raft*. Allo stesso modo gli effettori di *EGFR*, come Akt e Ras, sembrano migrare nella membrana plasmatica da domini di tipo *lipid raft* a domini *non raft* in seguito a segnali di attivazione (Pike et al., 2005). Dunque, è possibile ipotizzare che, attraverso l'alterazione di microdomini lipidici nelle membrane, l'attività di SCD1 permetta la formazione di un ambiente più favorevole per l'attivazione di vie di segnalazione che sostengono la sopravvivenza cellulare (Igal, 2016).

### **1.2.3 Versamenti pleurici come modello di studio del carcinoma polmonare**

Il carcinoma polmonare rappresenta una delle principali cause di morte a livello mondiale. La percentuale di sopravvivenza per i pazienti si aggira attorno al 15% e scende fino al 5% in presenza di metastasi; la prognosi infausta è dovuta sia alla difficoltà di una diagnosi precoce sia alla mancanza di strategie terapeutiche efficaci (Collins, Haines, Perkel, & Enck, 2007; Torre et al., 2015). Una complicazione del carcinoma polmonare viene rappresentata dai versamenti pleurici maligni (*MPEs*), frequenti nei pazienti affetti da adenocarcinoma polmonare (NSCLC) (Chen et al., 2013; Heffner & Klein, 2008). La formazione del versamento pleurico viene determinata da un accumulo di liquido pleurico, contenente o meno cellule tumorali, tra i due foglietti che delimitano la pleura. L'infiltrazione neoplastica avviene in seguito ad un'invasione diretta da parte di carcinomi del polmone, oppure mediante un'invasione linfatica o vascolare metastatica. Il risultato è la comparsa di un versamento pleurico con aumento della concentrazione proteica di liquido causata dall'alterata permeabilità capillare. Il carcinoma polmonare, i linfomi e le leucemie, insieme al carcinoma mammario, rappresentano i due terzi dei tumori responsabili della comparsa del versamento pleurico maligno. L'origine molecolare del carcinoma polmonare comprende interazioni complesse tra l'ambiente e suscettibilità genetica del soggetto. Il carcinoma polmonare evolve attraverso cambiamenti genetici ed epigenetici, includendo la deregolazione di *signaling*, potenziali *targets* per la chemio-prevenzione e la terapia.

Per comprendere l'origine e le caratteristiche del carcinoma polmonare, recenti lavori hanno suggerito l'utilizzo dei MPEs come modello di studio, sia per caratterizzare la varietà di cellule presenti ed il loro profilo genico, sia per isolare le cellule staminali tumorali putative, su cui svolgere indagini atte a comprendere i meccanismi molecolari alla base della tumorigenesi (Basak et al., 2009). Ciò si innesta con gli aspetti applicativi critici descritti in precedenza rafforzando l'orientamento verso un sistema biologico umano nell'investigazione degli aspetti peculiari delle CSCs.

#### **1.2.4 SCD1: regolatore della sopravvivenza di cellule staminali tumorali**

La prova fondamentale che attribuisce ad SCD1 il ruolo di motore immobile del cuore del tumore deriva da uno studio condotto su Cellule Staminali Pluripotenti umane (*hPSC*). È stato dimostrato che la sopravvivenza della popolazione cellulare staminale è intimamente correlata alla sintesi di MUFA, di cui SCD1 è catalizzatore. Quindi è stato eseguito un *high-throughput screening* per individuare molecole in grado di eliminare selettivamente *hPSC*. In particolare tra le 52.000 molecole analizzate, è stato individuato PluriSIn #1 (*pluripotent-specific inhibitors*) un inibitore selettivo dell'enzima SCD1, che determina un accumulo di acidi grassi saturi e una carenza di MUFA con conseguente induzione di stress del reticolo endoplasmatico, attivazione della *UPR (Unfolded Protein Response)* e blocco della traduzione, eventi che culminano nella morte cellulare. La ricerca conclude che tipi cellulari differenziati sono meno sensibili all'azione del PluriSIn #1 e che, l'inibizione di SCD1 ha un effetto tossico anche sulle cellule della massa interna di blastocisti murine durante lo sviluppo, sottolineando come l'attività di SCD1 sia correlata allo stato di pluripotenza di quest'ultime (Ben-David et al., 2013).

In accordo con queste evidenze e con la teoria delle CSCs sono stati condotti studi d'isolamento e caratterizzazione di cellule cresciute in condizioni di non aderenza in grado di formare degli sferoidi con caratteristiche simil-staminali tumorali. La comparazione dei *gene profiling* rivela un'espressione differenziale di alcuni geni coinvolti nel metabolismo lipidico, degli sferoidi rispetto alle cellule cresciute in condizioni di aderenza, tra questi uno dei geni maggiormente up-regolati negli sferoidi è SCD1 (Mancini et al., 2011) (Figura 5).

| Transcripts Cluster Id | Genesymbol      | NCI-H460 (Sphere/ Adherent) Gene Expression | MPE Gene Expression |
|------------------------|-----------------|---|---------------------|
| 7908459                | CFH             | UP  | UP                  |
| 8086985                | <b>CCL7A1</b>   | <b>UP</b>                                   | <b>UP</b>           |
| 8051583                | CYP1B1          | UP  | UP                  |
| 8140864                | <b>CYP51A1</b>  | <b>UP</b>                                   | <b>UP</b>           |
| 7950885                | FZD4            | UP  | UP                  |
| 8095680                | <b>IL8</b>      | <b>UP</b>                                   | <b>UP</b>           |
| 8040695                | KCNK3           | UP  | UP                  |
| 7985317                | <b>KIAA1199</b> | <b>UP</b>                                   | <b>UP</b>           |
| 7961365                | MANSC1          | UP  | UP                  |
| 8003332                | <b>MVD</b>      | <b>UP</b>                                   | <b>UP</b>           |
| 8062927                | PI3             | UP  | UP                  |
| 7920244                | <b>S100A8</b>   | <b>UP</b>                                   | <b>UP</b>           |
| 7905571                | S100A9          | UP  | UP                  |
| 8098195                | <b>SCAM1</b>    | <b>UP</b>                                   | <b>UP</b>           |
| 7929816                | SCD             | UP  | UP                  |
| 7941148                | <b>TM7SF2</b>   | <b>UP</b>                                   | <b>UP</b>           |
| 7939024                | TMEM16C         | UP  | UP                  |
| 8028652                | <b>ZFP36</b>    | <b>UP</b>                                   | <b>UP</b>           |
| 7994582                | SULT1A3         | UP  | UP                  |
| 7948667                | <b>AHNAK</b>    | <b>DOWN</b>                                 | <b>DOWN</b>         |
| 8070632                | CBS             | DOWN  | DOWN                |
| 7953291                | <b>CD9</b>      | <b>DOWN</b>                                 | <b>DOWN</b>         |
| 7978706                | FOXA1           | DOWN  | DOWN                |
| 7977854                | <b>JUB</b>      | <b>DOWN</b>                                 | <b>DOWN</b>         |
| 8017019                | MTMR4           | DOWN  | DOWN                |
| 7984364                | <b>SMAD3</b>    | <b>DOWN</b>                                 | <b>DOWN</b>         |
| 8056545                | STK39           | DOWN  | DOWN                |
| 8093950                | <b>S100P</b>    | <b>UP</b>                                   | <b>DOWN</b>         |
| 7899615                | SERINC2         | UP  | DOWN                |

Figura 5. Elenco di 29 geni differenzialmente espressi nelle colture di sferoidi (3D) rispetto alle colture in aderenza (2D) della linea cellulare stabile NCI-H460 e delle linee cellulari primarie PE/d10 e PE/e10 (Mancini et al., 2011).

In linea con questi risultati, gli sferoidi mostrano una maggior sensibilità all'inibizione farmacologica rispetto alle stesse cellule cresciute in condizioni di aderenza. La deplezione di SCD1 effettuata sia mediante il silenziamento genico, che tramite inibizione farmacologica, determina una diminuzione della capacità di formazione di cellule 3D *in vitro*, così come una riduzione del numero di cellule ALDH<sup>+</sup> (Aldehyde dehydrogenase) e dell'espressione di altri marcatori di staminalità.

È stato dimostrato come l'inibizione di SCD1 induca selettivamente la morte di cellule ALDH<sup>+</sup> e riduca la capacità degli sferoidi di originare tumori *in vivo* (Noto et al., 2013). Questi dati dimostrano il ruolo chiave di SCD1 nel regolare la sopravvivenza di CSCs di adenocarcinoma polmonare ed acquisiscono maggiore rilevanza, se inquadrati con le crescenti evidenze che propongono l'incremento dell'insaturazione degli acidi grassi come una caratteristica distintiva delle CSCs. Lo studio di *Tirinato et al.* sostiene come l'aumento dei livelli d'insaturazione, identificabile con un aumento del contenuto di LDs, rappresenti una caratteristica distintiva delle CSCs nel carcinoma del colon-retto. L'aumento del contenuto di LDs nella sottopopolazione di CSCs è direttamente correlato all'over-espressione del marcatore di superficie CD133 e ad una maggior attività del *pathway Wnt/β-*



catenina (Tirinato et al., 2015). Studi condotti su CSCs di carcinoma all'ovaio confermano i dati precedenti, in cui cellule ALDH<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> mostrano un aumento dei livelli d'insaturazione degli acidi grassi, del contenuto di *LDs* e coerentemente dei livelli di espressione di SCD1, insieme ad una maggior attivazione del *pathway* di NF- $\kappa$ B, rispetto a cellule negative per questi marcatori di staminalità.

In aggiunta a queste evidenze, è stato condotto uno studio per identificare i microRNAs che regolano la scelta tra autorinnovamento e differenziamento in CSCs di carcinoma alla mammella, identificando il miR-600 come regolatore cruciale del processo differenziativo. Uno dei target del miR-600 è SCD1, dunque l'over-espressione del miR, attraverso la *down*-regolazione di SCD1, porta ad una diminuzione dell'attività del *pathway* di *Wnt*/ $\beta$ -catenina con riduzione della capacità di autorinnovamento delle CSCs *in vitro* ed *in vivo* (El Helou et al., 2017). Quanto detto sottolinea il ruolo cruciale di SCD1 nella regolazione e sopravvivenza di CSCs, e come l'aumento della sintesi *de novo* di acidi grassi insaturi rappresenti una caratteristica distintiva per la loro l'identificazione.

#### **1.2.5 L'inibizione di SCD1 reverte la resistenza al CDDP in CSCs di polmone**

In accordo con la teoria delle CSCs, la progressione delle cellule tumorali seleziona un sottotipo caratterizzate da autorinnovamento e potenziale progressione clonogenica. È stato riportato che la frazione di popolazione cellulare identificata come CSCs di polmone, sia associata a prognosi infausta ed a resistenza ai farmaci convenzionali come CDDP, gemcitabina, docetaxel e ripresa tumorale (Liu et al., 2013; Pasini et al., 2012). In passato è stato dimostrato il coinvolgimento di SCD1 nella sopravvivenza di CSCs di polmone, nello specifico sono state isolate CSCs da *MPEs* e che esprimono elevati livelli sia di SCD1 che dei marcatore di staminalità, ALDH1A1, Nanog e Oct4 (Mancini et al., 2011; Noto et al., 2013; Roscilli et al., 2016). Inoltre, l'inibizione di *SCD1* induce la perdita della capacità di formazione delle cellule 3D, e stimola selettivamente le cellule ALDH<sup>+</sup> ad andare incontro ai processi di apoptosi (Noto et al., 2013).

Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo di *SCD1* nello sviluppo e progressione nei processi di tumorigenesi del colon, ovaio, tiroide, renale e recentemente anche nel carcinoma alla mammella (El Helou et al., 2017; Holder et al., 2013; Von Roemeling et al., 2015, 2013); ma finora non è stato investigato il ruolo di

SCD1 come fattore prognostico in combinazione con la staminalità in pazienti affetti da NSCLC. È sempre più evidente che nei tumori solidi si instauri un'alterazione del metabolismo degli acidi grassi associata all'incremento della sintesi dei MUFA, in particolare della ratio MUFA/SFA e all'aumento dei livelli di SCD1. Inoltre, le cellule tumorali necessitano dell'attività di SCD1 per la crescita, poiché è l'enzima responsabile della biosintesi dei fosfolipidi di membrana come "energy-storing lipids", e che l'inibizione di SCD1 induce arresto del ciclo cellulare e apoptosi (Igal, 2016). Nel recente lavoro di *Pisanu ME et al*, abbiamo dimostrato come SCD1 sia richiesto per la propagazione delle CSCs. È stato osservato un aumento di espressione di SCD1 in pazienti affetti da adenocarcinoma del polmone mediante immunistochemica e analisi bioinformatica (*TCGA datasets*) (Figura 6 a-c). I pazienti che presentano un'elevata espressione di SCD1 e dei marcatori di staminalità, CD24, CD133, CD44 e SOX2, correlano con la prognosi infausta rispetto ai pazienti con bassa co-espressione degli stessi marcatori. Ciò dimostra la correlazione positiva tra l'aumento dell'espressione di SCD1 ed elevati livelli dei marcatori di staminalità, all'interno della popolazione di CSCs, al fine di potenziare l'utilizzo dell'inibitore di SCD1. Indipendentemente dal recente interesse verso l'immunoterapia, la chemioterapia con composti a base di platino rimane la terapia convenzionale. La risposta iniziale delle cellule tumorali al CDDP si modifica in una successiva resistenza, in cui si selezionano cellule aventi caratteristiche CSCs. Lo studio dimostra che il trattamento con il CDDP tenda a selezionare le cellule tumorali con elevata espressione dei principali marcatori di staminalità, e le medesime cellule assumono una forma 3D con dimensioni e compattezza maggiore. Inoltre, il trattamento degli sferoidi con l'inibitore MF438 è selettivamente tossico per le CSCs, dimostrato sia dalla riduzione dei livelli dei marcatori di staminalità, sia dall'organizzazione strutturale di simil-aggregati delle cellule sopravvissute. La potenziale applicazione dell'inibitore di SCD1, negli schemi combinatori terapeutici, è supportata dai saggi condotti sulle cellule 3D trattate con CDDP in combinazione con MF438, poiché include una sinergica inibizione della formazione degli sferoidi (Figura 6 d). I risultati ottenuti sono consolidati dalla diminuzione dell'espressione dei marcatori di staminalità in seguito a co-trattamento delle cellule 3D con CDDP e MF438, sia nella linea stabile (NCI-H460) che in linee primarie da *MPEs* (PE 2/15, PE 4/15, PE 5/15; PE 0/11) (Figura 6 e).

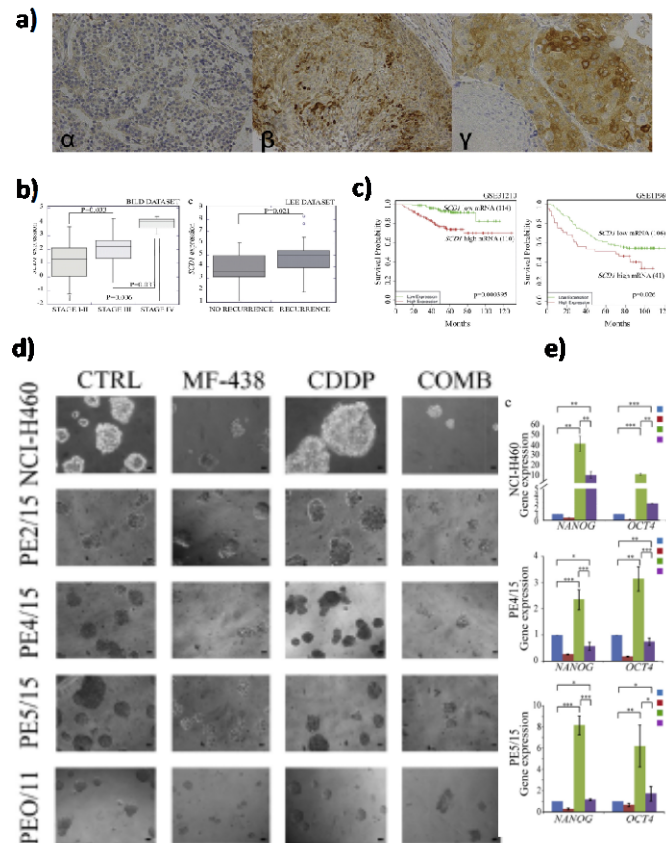


Figura 6. Elevati livelli genici e proteici di SCD1 sono associati a prognosi infausta e bassa sopravvivenza nell'adenocarcinoma del polmone. a) Immagine rappresentativa di immunohistochemica mostra la variabilità di espressione di SCD1 in sezioni di pazienti affetti da adenocarcinoma del polmone. Da sinistra verso destra, campione negativo per SCD1 (200x); campione positivo per SCD1 (200x), e colorazione positiva per SCD1 (400x). b) Microarray data ottenuta utilizzando ONCOMINE tool (BILD-dataset), di pazienti affetti da adenocarcinoma del polmone raggruppati per SCD1 in base alla stadiazione. Stadio I e II (n=60); stadio III e IV (n=17); e con ONCOMINE tool (LEE-data) a 5 anni. c) Dataset GSE31210 (stadio I e II), GSE11969 (stadio I-III) analizzato per l'espressione mRNA di SCD1 con il sistema computazionale Kaplan-Meier.  $p < 0.05$  è considerato statisticamente significativo. La resistenza al CDDP è revertita inibendo SCD1. d) Immagini rappresentative di sferoidi trattate con CDDP o MF438 dopo 7 giorni di coltura. e) Espressione genica di Nanog e Oct4 dopo trattamento con CDDP, MF438 singolarmente e in combinazione nelle cellule 3D stabili NCI-H460 e in primarie PE 4/15 e PE 5/15, ottenuta mediante RT-PCR. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (student t-test).

### 1.3 Hippo pathway: ruolo di YAP e TAZ nel cancro

Le proteine YAP (*Yes-associated protein*) e TAZ (*transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) funzionano da co-attivatori trascrizionali e rappresentano i principali effettori a valle del *pathway* di Hippo, che regola diversi processi cellulari come sopravvivenza, proliferazione, differenziamento, rigenerazione ed omeostasi tissutale (Moroishi, Hansen, & Guan, 2015). La prima evidenza dell'importanza sulla proliferazione cellulare deriva da studi effettuati in *Drosophila melanogaster*, dove mutazioni inattivanti i componenti di questa via determinano un'eccessiva crescita dei tessuti larvali (Pan, 2010). I componenti

del *pathway* comprendono un modulo chinamico evolutivamente conservato ed un modulo trascrizionale. Il modulo chinamico è costituito dalle chinasi MTS1/MTS2 (*mammalian STE20-like protein kinase 1/2*), ortologhe delle proteine Hippo e Warts identificate in *Drosophila*, e dalle chinasi LATS1/2 (*large tumor suppressor 1/2*), insieme ai loro rispettivi cofattori, le proteine SAV1 e MOB1A/B (Johnson & Halder, 2014).

Il modulo trascrizionale è costituito da YAP e TAZ, co-attivatori trascrizionali, che nel nucleo interagiscono con diversi fattori di trascrizione, come le proteine SMAD, TBX5, RUNX 1/2, p73, in particolare con le proteine TEAD (*TEA domain family members*) (S. Piccolo, Dupont, & Cordenonsi, 2014). Quando il modulo chinamico è attivo le chinasi, MTS1/MTS2 complessate con SAV1, fosforilano ed attivano le chinasi LATS1/LATS2. Le chinasi LATS1/LATS2 a loro volta fosforilano YAP e TAZ su specifici residui di serina e/o treonina, ritenute nel citoplasma attraverso l'interazione con la proteina 14-3-3 e degradate attraverso il sistema ubiquitina/proteosoma. Quando il modulo chinamico è spento, YAP e TAZ ipofosforilate traslocano nel nucleo e, attraverso il legame con le proteine TEAD e altri fattori di trascrizione, guidano l'espressione di geni coinvolti nel mantenimento della sopravvivenza e della proliferazione cellulare (Johnson & Halder, 2014) (Figura 7).

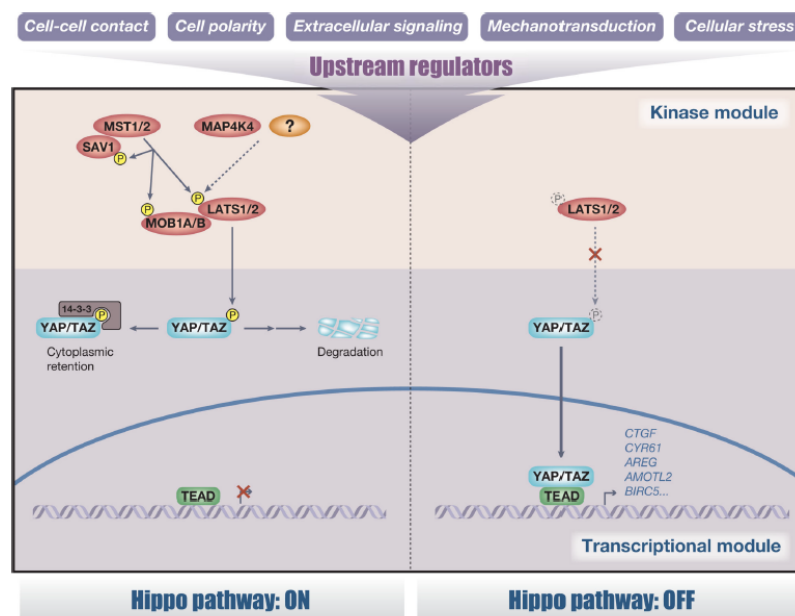


Figura 7. Rappresentazione schematica della regolazione di YAP e TAZ attraverso il pathway di Hippo (Moroishi et al., 2015).

Nella visione classica i componenti del modulo chinasi agiscono da oncosoppressori, mentre YAP e TAZ da oncogeni (Moroishi et al., 2015). Infatti, l'iper-attivazione di YAP/TAZ è molto diffusa in diversi tipi di tumori, come quello al polmone, alla mammella, al colon-retto, al fegato, al pancreas ed in diversi tipi di glioma. L'over-espressione di YAP/TAZ promuove la trasformazione neoplastica attraverso la deregolazione di meccanismi delle cellule tumorali: aumento della proliferazione cellulare per diretta attivazione di geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, aumento della sopravvivenza tramite up-regolazione di fattori anti-apoptotici, come i membri della famiglia Bcl-2 (Rosenbluh et al., 2012; Zanconato, Cordenonsi, & Piccolo, 2016).

L'attività di YAP e TAZ è stata associata alla resistenza ai trattamenti farmacologici. È stato riportato che l'aumento dell'espressione dei geni target di YAP/TAZ, CTGF (*connective tissue growth factor*) e Cyr61 (*cysteine-rich angiogenic inducer 61*), sia responsabile della resistenza al taxolo in cellule di carcinoma della mammella (Lai, Ho, Hao, & Yang, 2011). Inoltre, diversi studi riportano come l'iper-attivazione di YAP/TAZ promuova l'auto-rinnovamento e l'espansione di CSCs in diversi tipi di neoplasie (Bartucci et al., 2015; Basu-Roy et al., 2015; Hayashi et al., 2015; Song et al., 2014).

Le CSCs sono caratterizzate dalla capacità di autorinnovamento e metastatizzazione, a tal proposito è stato dimostrato come l'over-espressione di YAP e/o TAZ induca all'acquisizione del fenotipo mesenchimale in cellule di tumore alla mammella, suggerendo che il *pathway* di Hippo sia implicato nella soppressione della EMT (Cordenonsi et al., 2011).

Sebbene il *pathway* di Hippo sia stato il primo meccanismo identificato nella regolazione dell'attività di YAP/TAZ, il fatto che mutazioni nei suoi componenti sono rare nei tumori umani, lascia pensare che questa via non sia l'unica e la più rilevante nella regolazione di YAP/TAZ alla base della tumorigenesi (Harvey, Zhang, & Thomas, 2013; Zanconato et al., 2016). Studi recenti rivelano quanto i meccanismi che comportano la defosforilazione, l'attivazione e traslocazione nel nucleo di YAP e TAZ siano complessi e spesso indipendenti dalla stessa via di regolazione di Hippo, coinvolgendo altre vie di segnalazione, come il *pathway* di Wnt/ $\beta$ -catenina, noto per le proprietà oncogeniche (Moroishi et al., 2015). Lo studio di Azzolin et al. dimostra che YAP e TAZ vengono ritenuti nel citoplasma e contribuiscono alla funzione del complesso di degradazione di  $\beta$ -catenina, in

assenza della stimolazione da parte di del ligando *Wnt*. YAP/TAZ legano direttamente i componenti del complesso Axin ed APC, promuovendo il reclutamento di  $\beta$ -catenina, attraverso l'interazione di TAZ con l'ubiquitina ligasi  $\beta$ -TrCP, la sua ubiquitinazione e successiva degradazione. Al contrario, la stimolazione promossa da *Wnt* induce la destrutturazione del complesso di distruzione e il rilascio di YAP/TAZ, che assieme alla  $\beta$ -catenina migrano nel nucleo e promuovono la trascrizione dei geni target (Azzolin et al., 2014, 2012).

Un altro meccanismo, in grado di regolare l'attività di YAP/TAZ in maniera indipendente dal *pathway* di Hippo, dipende dagli stimoli meccanici cui le cellule sono sottoposte, ad esempio le interazioni con la matrice extracellulare, la forma cellulare e la tensione del citoscheletro. Questo tipo di regolazione di YAP/TAZ dipende dai segnali provenienti dal microambiente trasdotti attraverso i recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) (Zanconato et al., 2016). In particolare, l'attivazione tramite GPCRs delle GTPase appartenenti alla famiglia Rho, induce un riarrangiamento del citoscheletro con polimerizzazione dell'actina e conseguente legame di AMOT (*angiomotin*). AMOT è una proteina che lega i filamenti di actina F a livello delle giunzioni cellulari, ed è in grado di legare YAP e TAZ nel citoplasma in maniera indipendente dal loro stato di fosforilazione. Dunque, l'attivazione della via GPCR/RAC/Rho con polimerizzazione dell'actina porta al distacco di AMOT da YAP/TAZ contribuendo alla loro localizzazione nucleare (Moroishi et al., 2015). La scoperta che la GTPase Rho sia un regolatore dell'attività di YAP/TAZ ha permesso di evidenziare come questi due oncogeni fungano da sensori dello stato metabolico della cellula, in maniera indipendente dal *pathway* di Hippo (Zanconato et al., 2016).

Studi recenti in cellule tumorali di mammella dimostrano che il *pathway* del Mevalonato, fondamentale per la biosintesi del colesterolo, regola l'attività di YAP e TAZ. L'inibizione di questa via è sufficiente per bloccare la loro attività nucleare. La GTPase Rho, è attivata dalla prenilazione, una modifica post-traduzionale che prevede l'aggiunta di una catena lipidica per l'ancoraggio della proteina alla membrana plasmatica. Questi lipidi sono prodotti attraverso il *pathway* del Mevalonato e l'inibizione attraverso l'uso di statine della HMG-CoA reduttasi, enzima della via biosintetica, riduce la localizzazione in membrana della GTPase Rho e la localizzazione nucleare di YAP/TAZ (Sorrentino et al., 2014). Studi *in vitro* ed *in vivo* mostrano come il trattamento di cellule tumorali

con Cerivastatina abbia un effetto anti-proliferativo, apoptotico e provochi ad una forte riduzione della capacità di *self-renewal* di CSCs derivanti da linee cellulari primarie di glioblastoma (P. Jiang et al., 2014).

#### 1.4 Fattori Trascrizionali coinvolti nella regolazione di SCD1

I Fattori Trascrizionali (TFs) regolano l'espressione genica e rivestono un ruolo essenziale nello sviluppo e mantenimento dello stato proliferativo e regolatore dei diversi geni. Attraverso l'approccio computazionale è possibile identificare i siti di legame dei TFs sui rispettivi geni target, sia come analisi di singoli fattori che come combinazione di approccio, in grado di incrementare la rilevanza biologica nel set dei geni e dei target identificati (Essebier, Lamprecht, Piper, & Bodén, 2017). I TFs non agiscono in maniera indipendente, ma sono influenzati da caratteristiche genetiche ed epigenetiche che influenzano il legame con il DNA e la regolazione dell'espressione genica. Nel momento in cui si cerca di identificare i geni target partendo dal fattore trascrizionale, è necessario l'utilizzo di fonti di dati al fine di determinare non solo il legame ma anche il contesto del sito di legame. I genomi contengono diverse sequenze regolatrici essenziali per il controllo dell'espressione genica, identificati nei *silencers*, *insulator*, *enhancer*, e promotori (Thurman et al., 2012). La conoscenza sistematica delle sequenze regolatrici e della loro azione, congiuntamente ai moduli di regolazione genica, è emersa mediante l'utilizzo del sequenziamento massivo che permette di investigare l'intero genoma. Le interazioni DNA-proteina e le modificazioni epigenetiche sono cruciali per la regolazione trascrizionale. Il *profiling* genomico dei siti di legame dei Fattori Trascrizionali (TFBS), le modificazioni istoniche e la presenza di proteine che legano il DNA, sono indispensabili per comprendere la regolazione genica. Infatti, le metodologie d'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) utilizzano un anticorpo che riconosce specificatamente una proteina, un fattore trascrizionale o un istone, al fine di legarsi ad essi ed individuare le posizioni di legame con il DNA. Con il rapido sviluppo delle tecnologie di sequenziamento, l'immunoprecipitazione della cromatina è spesso seguita dal sequenziamento genico diventando un'analisi efficace per identificare i locus del genoma (S. Jiang & Mortazavi, 2018). La ChIP-seq permette di osservare i diversi siti in cui i fattori trascrizionali si legano, inclusi le regioni

distali, prossimali, introniche e intergeniche (Bailey et al., 2013; Ma & Wong, 2011).

Il legame dei TFs nelle diverse regioni genomiche dipende dal tipo di cellule, dalle condizioni, e da caratteristiche genetiche ed epigenetiche. Tuttavia, il legame di un singolo fattore trascrizionale non è sufficiente per procurare effetti diretti sull'espressione genica dei geni adiacenti, piuttosto avviene sotto il controllo combinato di molteplici TFs. Pertanto, i dati di ChIP-seq vengono spesso integrati con altre tecniche genomiche di tipo funzionale, al fine di decifrare il controllo basale dell'espressione genica, che incrementano con una serie di informazioni derivanti sia dall'apertura o chiusura della cromatina, sia dalle varianti dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP). I modelli probabilistici dell'analisi dei dati di ChIP delle modificazione dei TFs e degli istoni, avviene simultaneamente sulla cromatina di numerosi genomi e sistemi cellulari (S. Jiang & Mortazavi, 2018). L'integrazione computazionale di ChIP si avvale di analisi genomiche di tipo funzionale come il sequenziamento dell'RNA, mediante RNA-seq, per valutare i livelli di espressione genica. Inoltre, con la DNase I Hypersensitivity (DSH) o con il saggio per l'accessibilità della cromatina trasposta (ATAC-seq) è possibile studiare l'accessibilità della cromatina (Essevier et al., 2017; Shen et al., 2012; Soufi et al., 2015).

Nell'ambito del progetto di Dottorato, avendo approfondito i meccanismi regolatori di SCD1 in CSCs a valle, associati al modulo trascrizionale YAP/TAZ, è importante focalizzare l'attenzione verso lo studio dei meccanismi trascrizionali a monte del gene. Studi condotti sulla regolazione trascrizionale di SCD1 hanno identificato una serie di TFs coinvolti nel metabolismo lipidico delle cellule tumorali in grado di legare la regione del promotore del gene. I TFs individuati putativamente regolatori di SCD1 sono: Sterol-Regulatory Element-Binding Protein (SREBP), Nuclear Factor (NF) Y e c-MYC (Baker, Hayden, & Ghosh, 2011; Benatti et al., 2016; Chatterjee et al., 2009; Guo, Bell, Mischel, & Chakravarti, 2014; Hsieh, Walton, Altman, Stine, & Dang, 2015; Y. Wu et al., 2016).

#### **1.4.1 Sterol Regulatory Element Binding Proteins (SREBP)**

Emergenti evidenze identificano le proteine SREBP come TFs deputate al controllo del metabolismo lipidico attraverso un *link* tra il *signaling* oncogenico e il



metabolismo tumorale. È dimostrato che il fenotipo lipogenico rappresenta una delle principali caratteristiche delle cellule tumorali, poiché esiste una cospicua richiesta di lipidi nei rapidi processi di proliferazione tumorale (Menendez & Lupu, 2007). Inoltre, come descritto in precedenza, i fosfolipidi e il colesterolo sono i componenti principali delle membrane cellulari, a tal fine è necessario studiare la regolazione del metabolismo lipidico focalizzato nel controllo delle vie di segnalazione che coordinano il metabolismo di glucosio, glutammina e sintesi lipidica. Recentemente è stato dimostrato come SREPB sia implicato nel controllo della lipogenesi nell'attivazione della tumorigenesi, nello specifico, il suo ruolo nella sintesi degli Acidi Grassi saturi e insaturi, nel metabolismo del glucosio, e nell'endocitosi di lipoproteine a bassa densità (LDL).

Le proteine SREPB hanno tre domini funzionali: una porzione amino-terminale (68kDa) con la funzione di fattore trascrizionale; una regione centrale con due domini transmembrana legati da un dominio nel lume del Reticolo Endoplasmatico (RE); una porzione carbossi-terminale che regola l'attività della proteina che interagisce con SCAP (Brown & Goldstein, 1997; DeBose-Boyd et al., 1999; Moon et al., 2012; Nohturfft, DeBose-Boyd, Scheek, Goldstein, & Brown, 1999; Williams et al., 2013; Ye & DeBose-Boyd, 2011). SREPB presenta tre isoforme: SREPB1a, SREBP1c, e SREPB2. Le isoforme sono codificate da geni diversi, attivano conseguentemente differenti geni target, e la loro espressione viene regolata indipendentemente a diversi livelli (Hua, Wu, Goldstein, Brown, & Hobbs, 1995).

Le proteine SREPB sono localizzate nel RE e sono sintetizzate come precursori aventi peso molecolare 125 kDa. Il precursore è trasportato al Golgi da una proteina *Chaperone*, per essere clivato da una proteasi e ottenere la forma trascrizionalmente attiva o matura (peso molecolare 68 kDa). Numerosi studi hanno dimostrato che la presenza della proteina matura è controllata dai livelli d'insulina, di glucosio, dagli acidi grassi polinsaturi (PUFA) e dai livelli di ossisteroli. Recentemente, è stato dimostrato che l'inibizione della sintesi del colesterolo non sia dovuta al colesterolo stesso, ma una molecola di ossisterolo derivante dall'ossidazione degli steroli. I geni SREBP sono fattori trascrizionali helix-loop-helix che attivano i gene target aventi uno Sterol Regulatory Element (SRE) (Chatterjee et al., 2009; Y. Li et al., 2016; Shimano, 2001; Shimano et al., 1997; Shimomura et al., 1999). SREPB1 riveste un ruolo cruciale nel *signaling*

oncogenico e nel metabolismo delle cellule tumorali poiché regola il pathway della sintesi *de novo* degli acidi grassi, in cui sono implicati gli enzimi ACL, ACC e FASN. Numerosi studi riportano l'associazione tra l'over-espressione di SREBP1 ed alterazioni e caratteristiche di malignità, come avviene nel carcinoma dell'endometrio, della prostata, nell'epatocarcinoma e nel glioblastoma (Guo et al., 2014; C. Li et al., 2014). In linee cellulari di carcinoma ovarico il *knockdown* di SREBP1 è associato ad inibizione della crescita cellulare, migrazione ed invasività, inoltre induce le apoptosi cellulare (Y. C. Kim, Gomez, Fox, & Ntambi, 2000; Nie et al., 2013; J M Ntambi, 1999; Tabor, Kim, Spiegelman, & Edwards, 1999).

#### 1.4.2 MYC

Il gene MYC codifica per una proteina che si lega a sequenze di DNA appartenenti al dominio di diversi geni. Il prodotto genico di MYC agisce da protooncogene, infatti la traslocazione del cromosoma 8 (t 8:14) è implicata nell'insorgenza del Linfoma di Burkitt. In molte neoplasie MYC viene costitutivamente espresso e rappresenta uno degli oncogeni più frequentemente attivati nei tumori umani, poiché è coinvolto in molti processi cellulari come apoptosi, proliferazione, adesione cellulare, segnalazione cellulare, e trasformazione cellulare (Hsieh et al., 2015; Majello & Perini, 2014; Jialiang Wang et al., 2008). Il dominio amino-terminale di c-MYC contiene tre sequenze altamente conservate fondamentali per la stabilità della proteina, per le interazioni con altre molecole, per l'attivazione o repressione trascrizionale dei geni target. Inoltre, presenta un dominio di transattivazione o TAD, in cui avviene l'interazione tra c-MYC e le proteine essenziali al rimodellamento cromatinico, che gli permette di avere un ruolo a livello epigenetico sui geni target (Lüscher & Larsson, 1999). La porzione carbossi-terminale è costituita da un dominio *helix-loop-helix-leucine zipper* (HLH-LZ) importante per la dimerizzazione con altre proteine con lo stesso motivo. c-MYC, mediante un complesso etero-dimerico con la proteina MAX, attiva trascrizionalmente molti geni target tramite il riconoscimento di *E-boxes* sulle regioni promotrici.

I geni target di c-MYC sono coinvolti nel ciclo cellulare, nel metabolismo, nella sintesi proteica, in fenomeni di farmacoresistenza di numerosi chemioterapici in diversi tumori umani (Blackwood & Eisenman, 1991; Gatti et al., 2009). Il protooncogene c-MYC svolge un ruolo chiave nella proliferazione cellulare, nello

specifico nella regolazione delle chinasi dipendenti dalla ciclina G1, poiché la sua trascrizione genica è rapidamente indotta dalla stimolazione miogenica, e al contrario, risulta essere poco presente nelle cellule quiescenti. La presenza di c-MYC è versatile e specifica per tipologia tumorale, studi effettuati su modelli transgenici sostengono che la riattivazione di c-MYC, dopo la distruzione transitoria, è in grado di ripristinare la crescita tumorale sostenendo l'attivazione delle CSCs dormienti (Arvanitis & Felsher, 2006). Tuttavia, la riattivazione delle cellule tumorali può avvenire anche in assenza di c-MYC, suggerendo che le CSCs potrebbero aver accumulato mutazioni aggiuntive per compensare la perdita del proto-oncogene (Dolezal et al., 2017; Jialiang Wang et al., 2008; Y. Wu et al., 2016). Recenti lavori basati su altri modelli tumorali dimostrano che l'espressione di c-MYC altera la proliferazione cellulare e la senescenza indotta. I modelli descritti possono rappresentare l'effetto della perdita di c-MYC in popolazioni cellulari omogenee, in particolare, in modelli geneticamente modificati guidati dall'induzione della sua espressione (Trop-Steinberg & Azar, 2018; Jialiang Wang et al., 2008; C.-H. Wu et al., 2007). I primi studi hanno riportato il coinvolgimento di c-MYC nel metabolismo lipidico, ossia, nella regolazione della lattato deidrogenasi A (LDHA) che converte il piruvato in lattato nei processi di glicolisi. Successivamente è stato dimostrato che c-MYC, attraverso la sua up-regolazione, contribuisca direttamente all'effetto Warburg (glicolisi aerobica), e alle capacità delle cellule neoplastiche di convertire il glucosio in piruvato, in presenza di un'adeguata tensione di ossigeno (Hsieh et al., 2015). Recenti studi mostrano che le alterazioni del metabolismo del glucosio e glutammina correlate alla tumorigenesi sono influenzate fortemente dall'espressione di c-MYC. In particolare, il metabolismo ipossico della glutammina c-MYC-dipendente, anche in assenza di glucosio, suggerisce l'influenza della sua espressione. Infatti, nei processi di trasformazione neoplastica, l'overespressione di c-MYC è concomitante alla conversione del glucosio a lattato e all'ossidazione della glutammina nel ciclo di Krebs. In condizioni d'ipossia, con elevati livelli di c-MYC, una sostanziale frazione di glucosio è convertita in lattato e la glutammina continua ad essere metabolizzata dal ciclo di Krebs, usato per la sopravvivenza cellulare (Hsieh et al., 2015; Le et al., 2012).

### 1.4.3 Nuclear Factor-Y (NF-Y)

Il Fattore Nucleare NF-Y è una proteina eterotrimerica, composta da tre subunità: NF-YA, NF-YB e NF-YC. I geni che codificano i TFs nucleari sono altamente conservati (Gurtner, Manni, & Piaggio, 2017). Il dimero NF-YB e -YC contiene dei domini istonici per facilitare la dimerizzazione e la conseguente traslocazione nel nucleo dal citosol, in cui NF-YA viene reclutato per formare un complesso in grado di legare il DNA e regolare la trascrizione. NF-YA è una proteina di 43-45 kDa caratterizzata da tre domini: un dominio di trans-attivazione ricco di glutammina nell'amino-terminale; un dominio centrale ricco di serina e treonina; una porzione carbossi-terminale adibita al riconoscimento del DNA e al legame con le subunità -YB e -YC. NF-YA presenta due isoforme principali: NF-YA *long* e NF-YA *short*, a cui manca una porzione di 28 nucleotidi codificati dall'esone 3 nel dominio di trans-attivazione (Dolfini, Gatta, & Mantovani, 2012; Fleming et al., 2013). Sia la subunità -YB che -YC contengono dei domini putativi dell'istone; inoltre, -YC possiede un dominio di trans-attivazione ricco di glutammina nella porzione C-terminale. Le tre subunità -YA, -YB e -YC sono necessarie affinché avvenga l'associazione sul promotore dei geni target, mediante il legame con la sequenza regolatoria consenso (CCAAT); tuttavia anche altre proteine sono in grado di legare la sequenza CCAAT. Numerosi studi hanno dimostrato che i TFs hanno differente specificità di sequenza, poiché altri TFs (C/EBP e NF1) sono stati associati alla sequenza regolatoria CCAAT. È possibile ipotizzare che la maggior parte delle boxes CCAAT sono svincolate dal legame con NF-Y (Gurtner et al., 2017).

NF-Y regola la trascrizione di molti geni coinvolti nel ciclo cellulare, ed ha un ruolo chiave nella proliferazione di molti processi fisiologici (Dolfini, Gatta, et al., 2012; Fleming et al., 2013). Tuttavia l'insorgenza dei processi tumorali sono spesso associati alla presenza di lesioni dovute a una proliferazione incontrollata e aberrante, e perdita o alterazione dei fattori trascrizionali critici associati al cancro. È stato dimostrato che NF-Y regola la trascrizione di geni over-espressi e/o coinvolti nella trasformazione cellulare, parzialmente dipendente dalla capacità di interagire con i TFs oncogeni o oncosoppressori (Dolfini, Zambelli, Pedrazzoli, Mantovani, & Pavesi, 2016; Fleming et al., 2013; Gurtner et al., 2017; Hanahan & Weinberg, 2011; Mantovani, 1998; Nardone, Chaves-Sanjuan, & Nardini, 2017; Zambelli & Pavesi, 2017). Un modello di sviluppo della

tumorigenesi sostiene che la neoplasia origina dalla trasformazione delle SCs in CSCs. Molti studi dimostrano che alcuni TFs delle Cellule Embrionali Staminali (ES) ricoprono un ruolo cruciale nel mantenimento delle CSCs. Confrontando i modelli di espressione dei tumori rispetto ai tessuti sani, sono stati identificati degli arricchimenti di boxes CCAAT e E2F nelle regioni regolatorie dei geni up-regolati nelle neoplasie, coerentemente con gli studi dei TFBS in diversi tipi di tumore (Basile et al., 2016; Dolfini et al., 2016).

Alcuni gruppi di ricerca hanno focalizzato la loro attenzione su NF-YA, poiché il coinvolgimento dell'isoforma in questione è implicata nella regolazione delle SCs, e tende ad aumentare la capacità proliferativa delle CSCs. Studi bioinformatici, condotti sui siti di legame di NF-YA, hanno individuato le stesse sequenze genomiche per i TFs staminali nelle ESCs (cellule staminali embrionali totipotenti). In particolare il 30-50% dei picchi di arricchimento di Nanog presentano i siti di legame di NF-Y e, affinché avvenga l'associazione di Nanog è necessario il legame di NF-Y sul genoma (Dolfini, Minuzzo, Pavesi, & Mantovani, 2012).

#### **1.4.4 Nuclear Factor (NF)-kB**

Il Fattore Nucleare (NF)-kB è un TFs che induce o reprime l'espressione genica legandosi al genoma in siti specifici sui promotori o *enhancers*, al fine di determinare la funzione delle sue diverse subunità. Esistono cinque membri della famiglia di NF-kB: RelA (p65); RelB; c-Rel; p50/p105 (NF-kB1) e p52/p100 (NF-kB2) che possono formare complessi omo-eterodimeri. I complessi NF-kB sono normalmente sequestrati nel citoplasma da Ikb, proteine inibitorie, e la loro attivazione avviene tramite la fosforilazione di Ikb e la traslocazione nucleare di NF-kB. Le subunità di NF-kB sono soggette a modificazioni ed interazioni regolatorie che ne determinano sia la specificità verso i geni target, che l'attività trascrizionale. Le modificazioni a carico di NF-kB, come ad esempio attraverso IKK, determinando la capacità di interagire con co-attivatori o co-repressori nei processi di tumorigenesi (Hayden & Ghosh, 2004; Polager & Ginsberg, 2008). NF-kB interagisce con i fattori di trascrizione bZIP, come ad esempio C/EBP $\beta$ , Jun, ATF, CREB e Fos; e proteine zinc-finger come Sp1 e EGR1 (Hoffmann, Natoli, & Ghosh, 2006). L'attivazione di NF-kB induce sia la riprogrammazione dell'espressione genica conseguente a stimoli cellulari dei geni target, che la

generazione di segnali di *feedback* che ne influenzano la funzione e modificano la segnalazione di alcuni *pathway* (Bonizzi & Karin, 2004).

La funzione pro-oncogenica si esplica nel momento in cui NF- $\kappa$ B è attivato cronicamente nel nucleo di cellule tumorali mediante la up-regolazione dei geni target, attraverso l'attivazione dei geni anti-apoptotici, Bcl-xl e X-IAP, spesso causa della perdita di efficacia di terapie oncologiche (Baker et al., 2011; Mancini et al., 2018). NF- $\kappa$ B promuove altri processi oncogeni, come ad esempio la proliferazione delle cellule tumorali attraverso la Ciclina D1 e c-MYC, oppure collabora con p53 contro gli oncogeni, portando all'arresto del ciclo cellulare con il fine ultimo di instaurare i meccanismi di riparazione del danno al DNA provocato dai processi tumorali (Hoesel & Schmid, 2013; Luo et al., 2005; Ryan, Ernst, Rice, & Vousden, 2000).

#### **1.4.5 Modificazione degli istoni**

Le alterazioni epigenetiche svolgono un ruolo fondamentale nell'insorgenza e nella progressione dei tumori, oltre alle trasformazioni legate ai cambiamenti genetici. L'epigenetica include fenomeni di acetilazione, metilazione, fosforilazione e ubiquitinazione del DNA, che rappresentano modificazioni istoniche che costituiscono l'epigenoma (Mikkelsen et al., 2007). La struttura della cromatina è fondamentale nella regolazione di varie funzioni nucleari, come la trascrizione, la replicazione, la ricombinazione e la riparazione del DNA. Mentre il processo di acetilazione degli istoni determina spesso l'attivazione genica, il meccanismo di metilazione è più complesso, poiché numerosi studi sostengono che specifici pattern di metilazione sono correlati a un aumento o una riduzione di espressione del gene ad esso associato. L'acetilazione della lisina o dell'arginina tende ad allentare la struttura cromatinica poiché rimuove la carica positiva dell'amminoacido, ad opera dell'istone acetil-transferasi (HAT, histone acetyl transferase). Invece, la deacetilazione istonica è eseguita dalle deacetilasi (HDAC), la metilazione, dimetilazione o trimetilazione avviene per effetto di una serie di tre istone metil-trasferasi, cui corrispondono tre demetilasi (Martin & Zhang, 2005).

Uno dei tratti distintivi della cromatina delle ES è rappresentato dalla metilazione bivalente della lisina 4 (K4) lisina 27 (K27) dell'istone 3 (H3), spesso sovrapposta a TFs legati ai geni che guidano il differenziamento e staminalità. È noto che la

regolazione dell'espressione genica è coinvolta nel legame dei TFs nei promotori dei geni bersaglio, ma dipende anche dalla caratterizzazione degli eventi epigenetici, incluse le modificazioni degli istoni. Fondamentalmente, i cambiamenti della struttura della cromatina legati agli istoni possono indurre attivazione o inattivazione dell'espressione genica. La trimetilazione H3K4 induce attivazione trascrizionale, al contrario H3K27me3 provoca il silenziamento genico (Chapman-Rothe et al., 2013; Ngollo et al., 2017). La trimetilazione di H3K4 e H3K27 sono catalizzate rispettivamente dal gruppo di proteine Trithorax e Polycomb, responsabili dell'eredità mitotica dei programmi di espressione genica *lineage*-specifici aventi un ruolo chiave nel differenziamento. Inoltre, le proteine Polycomb hanno funzioni essenziali nel mantenimento delle ES, e durante i processi di differenziamento mostrano una ridotta espressione, fase in cui i domini bivalenti tendono ad assumere sia stati attivi legati a H3K4, che silenti, per quanto concerne H3K27 (Bernstein et al., 2006). Alcuni studi hanno suggerito che i domini bivalenti tendano a silenziare i geni legati al differenziamento con lo scopo di mantenerli pronti per l'attivazione successiva, ogni qualvolta che la differenziazione progredisce, oppure è stata completata (Chapman-Rothe et al., 2013).

Lo studio si focalizza verso le modifiche degli istoni che svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo e avanzamento del cancro. Alcuni studi hanno ipotizzato che le cellule aventi i geni trimetilati, sono più vulnerabili e soggette a silenziamento epigenetico nella tumorigenesi, come è stato dimostrato nel carcinoma ovarico (Ohm et al., 2007). Assodata l'ipotesi che le CSCs sono una sottopopolazione di cellule tumorali, aventi caratteristiche simili alle SCs, sono ritenute responsabili della crescita sostenuta nei tumori, e le modificazioni istoniche rappresentano un segno distintivo della cromatina coinvolte nei processi di differenziamento (Mikkelsen et al., 2007; Vastenhouw et al., 2010; Zaidi et al., 2017).

## 1.5 Sistema CRISPR / Cas9

Il sistema CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas) è stato originariamente descritto come sistema immunitario a

carattere adattivo nei batteri, nella difesa dagli attacchi infettivi di batteriofagi e contro trasferimenti di plasmidi. È stato identificato per la prima volta nel 1987, dal ricercatore Yoshizumi Ishino, dell'Università di Osaka (Giappone). Ishino clonò involontariamente una porzione di CRISPR insieme al gene di suo interesse, iap (inhibitor of apoptosis), nel batterio *Streptococcus Pyogenes*. La porzione di CRISPR fu descritta come ripetizioni di sequenze di DNA organizzate in tandem e presenti ad intervalli irregolari (Ishino, Shinagawa, Makino, Amemura, & Nakata, 1987). Nel 2001, il microbiologo Francisco Mojica, dell'Università di Alicante (Spagna), insieme ai suoi collaboratori scoprì la presenza di un cluster di ripetizioni di DNA negli archea. Solo nel 2001, Mojica e Ruud Jansen, dell'Università di Utrecht (Paesi Bassi), che stava studiando altre ripetizioni interrotte, proposero l'acronimo universale CRISPR per identificare le tutte sequenze ripetitive di DNA interrotte. La prima ricerca che ipotizzò un ruolo di CRISPR/Cas nell'immunità adattativa fu pubblicata da Mojica, che dimostrò la presenza di un sistema simile a quello degli RNA interference negli eucarioti (Bhaya, Davison, & Barrangou, 2011; P. D. Hsu, Lander, & Zhang, 2014; Francisco J.M. Mojica, Díez-Villaseñor, García-Martínez, & Soria, 2005). Nel 2012, nei laboratori di Charpentier e Doudna, svilupparono un meccanismo che ha reso possibile l'applicazione della tecnologia CRISPR/Cas nel sistema di editing genetico, che ha rivoluzionato il mondo della biologia cellulare (Jinek et al., 2012). La facilità e l'efficacia delle applicazioni CRISPR-Cas sviluppate per gli eucarioti provengono dai numerosi studi precedenti condotti nei procarioti, e rappresenta uno strumento potente e versatile di manipolazione genetica per creare modelli in vitro e in vivo e studiare la funzione genica in un contesto cellulare specifico in molti organismi (Doudna & Charpentier, 2014; F. Jiang & Doudna, 2015).

### **1.5.1 Il sistema CRISPR/Cas: meccanismo di azione**

Nel momento in cui è stato dimostrato che il CRISPR/Cas ha un ruolo immunitario a carattere adattativo, permettendo al 90% degli Archea e al 40% degli Eubatteri di difendersi verso l'attacco di batteriofagi e verso il trasferimento di plasmidi, il loro studio è stato esponenzialmente approfondito. È un sistema versatile che consente diversi tipi di approcci ingegneristici che superano i limiti della manipolazione genetica tradizionale (Cong et al., 2013; Gasiunas, Barrangou, Horvath, & Siksnyš, 2012). Il sistema CRISPR è basato sull'azione di



un Endonucleasi guidata dall'RNA (proteina *Cas*) in grado di appaiarsi a tratti di DNA endogeno tramite molecole di RNA che servono come guide. Il sistema è costituito da due elementi principali, dai loci CRISPR costituiti da una serie di ripetizioni del DNA palindromiche (30 bp) distanziate da sequenze DNA specifico chiamate *proto-spacer*, acquisite nella fase di infezione, e utilizzate nelle invasioni successive per distruggere gli acidi nucleici invadenti (CRISPR RNA o crRNA). Il secondo elemento è costituito dai geni *Cas* associati situati in prossimità dei loci CRISPR e codificano per un'ampia varietà di proteine con diverse funzioni.

La tecnologia CRISPR/*Cas* è un sistema immunitario di tipo adattativo, mediante cui viene acquisita una resistenza verso elementi genetici estranei. Il suo funzionamento è suddiviso in tre fasi, la prima è di adattamento in cui l'*host* incorpora "nuovi *spacers*" di acidi nucleici esogeni appartenenti al virus che infetta la cellula, sono digeriti dalle nucleasi batteriche e acquisiti nel locus CRISPR. Il meccanismo di difesa è un sistema di sorveglianza della memoria. La seconda fase di reinfezione e biogenesi del crRNA si attua attraverso la trascrizione e processamento, ad opera di una endoribonucleasi, di CRISPR in piccoli *small interfering* crRNA. Nell'ultima fase di targeting, il crRNA forma un complesso con il *trans-activating* crRNA (tracrRNA) in grado di guidare la nucleasi *Cas9* sulle sequenze complementari su cui effettuare il taglio degli acidi nucleici (Barrangou, 2014; Bhaya et al., 2011). Riguardo i meccanismi di interferenza, si distinguono tre tipi di sistema di CRISPR/*Cas* (tipo I, II, III). Nel sistema di tipo I e II, affinché avvenga un corretto targeting è necessario che vicino alla sequenza target, identificata da *Cas9*, ci sia un sistema altamente conservato costituito da una sequenza di 2-6 nucleotidi che prende il nome di PAM (protospacer adjacent motif). Il PAM canonico è la sequenza 5'-NGG-3' associata alla nucleasi *Cas9* dello *Streptococcus pyogenes* (*SpCas9*); altre PAM sono associate ad altre proteine *Cas9* nei batteri (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus thermophilus*) (Jinek et al., 2012, 2014; Francisco J.M. Mojica & Montoliu, 2016; Nishimasu et al., 2014; Shah, Erdmann, Mojica, & Garrett, 2013; Yan Zhang et al., 2013). Il sistema di tipo II presenta un numero di proteine *Cas* minore rispetto ai tipi I e III, ma è maggiormente utilizzato in ricerca. Nei sistemi di tipo III, il meccanismo richiede multiple proteine *Cas* per il legame al crRNA, e

contribuisce al riconoscimento di sequenze target non solo a DNA ma anche a RNA (Barrangou, 2014; Bhaya et al., 2011).

Sono state individuate due classi di CRISPR/Cas caratterizzate dalla presenza di differenti sequenze ripetute, diverse proteine Cas e differenti modalità d'azione. La classe 1 è caratterizzata un locus CRISPR dalla presenza di multi-subunità Cas, mentre la classe 2 è costituita da un locus CRISPR con una singola e grande proteina Cas (F. Jiang & Doudna, 2015; Shmakov et al., 2017; Zetsche et al., 2015). Gli strumenti CRISPR/Cas seguono la logica descritta per altre nucleasi di modifica del genoma, come ZFN (zinc-finger nucleases) o TALENs (transcription activator-like effector nucleases) (Figura 8).

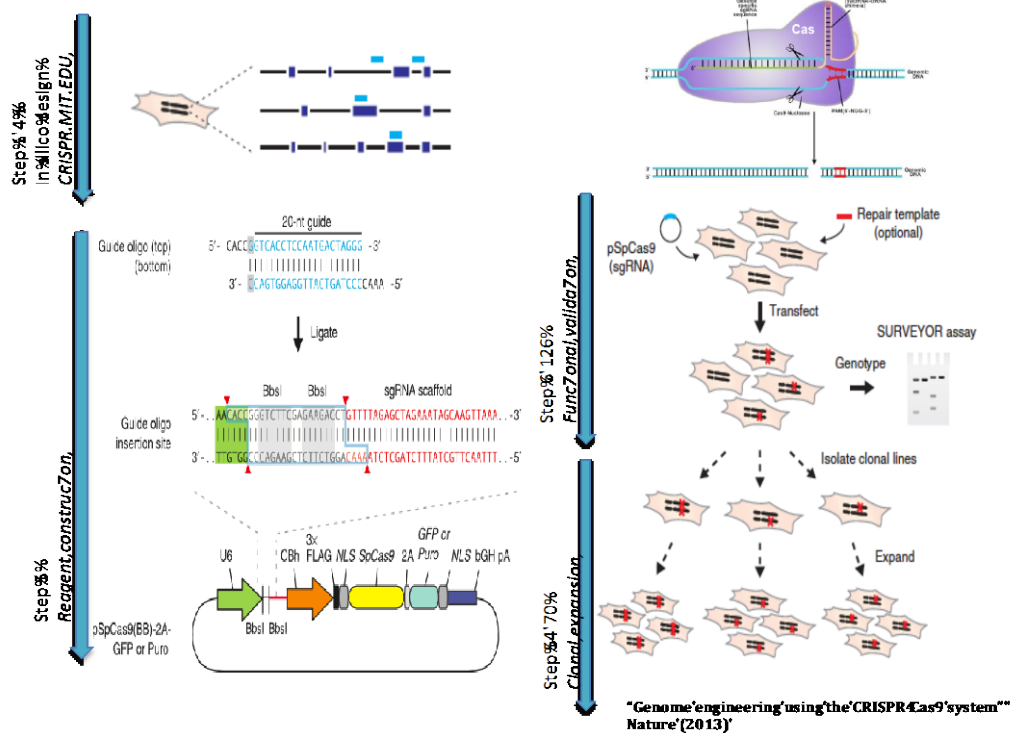


Figura 8. Schema riassuntivo dell'efficienza di editing della tecnologia del CRISPR/Cas9 (Fa Ann Ran et al., 2013).

Tuttavia, gli strumenti di CRISPR/Cas utilizzano brevi molecole di RNA per guidare l'omologia richiesta per colpire le rotture a doppio filamento (DSB) prodotte dalle nucleasi associate (Chu et al., 2015; Komor, Badran, & Liu, 2017; Maruyama et al., 2015; F. J M Mojica, Díez-Villaseñor, Soria, & Juez, 2000). La maggior parte delle applicazioni CRISPR/Cas derivano dagli strumenti CRISPR/Cas9 di *Streptococcus pyogenes*. Altri sistemi simili a CRISPR/Cas sono isolati e caratterizzati da altri procarioti, e strumenti più efficienti potrebbero

essere scoperti per migliorare la modifica del genoma (Komor, Badran, & Liu, 2017; Fa Ann Ran et al., 2013; Rojo et al., 2018).

### 1.5.2 Applicazioni della tecnologia CRISPR

Il sistema CRISPR/Cas9 è stato ampiamente utilizzato come strumento di modifica del genoma in diversi tipi di cellule e organismi. Oltre la classica applicazioni knock-out e knock-in, sta diventando sempre più evidente la sua versatilità. Infatti, le applicazioni sono molteplici incluso il controllo trascrizionale, la regolazione epigenetica e generazione di modelli animali (Komor, Badran, Liu, et al., 2017). Oltre ad ampliare l'ambito di editing genomico, i ricercatori hanno migliorato la specificità del targeting del DNA, tanto da diventare una priorità usando una varietà di approcci. I metodi includono ChiP-seq, analisi mirata di siti genomici identificati attraverso analisi computazionale, metodi di profilazione in vitro, sequenziamento dell'intero genoma, il GUIDE-seq e il metodi BLESS (Komor, Badran, Liu, et al., 2017).

Il sistema CRISPR/Cas9 di tipo II è basato su una singola endonucleasi capace di tagliare il doppio filamento su precise sequenze target se legata ad una sequenza guida (crRNA-tracrRNA o sgRNA) (Briner et al., 2014; Fu, Sander, Reyon, Cascio, & Joung, 2014; F. Ann Ran et al., 2013). La semplicità progettuale e molecolare della tecnologia CRISPR/Cas permette di avere un campo ampio di applicazioni. Nei mammiferi, le rotture che avvengono sul DNA a doppio filamento possono essere parzialmente riparate attraverso il *pathway* NHEJ (Miyaoka et al., 2016; Rojo et al., 2018). Questo concetto può essere sfruttato utilizzando la nucleasi Cas9 di *Streptococcus pyogenes* e un appropriato sgRNA, per indurre inserzioni e delezioni nella sequenza o silenziare ogni gene che contenga la sequenza PAM (Shah et al., 2013). Tuttavia, nelle cellule di mammifero le rotture sul DNA a doppio filamento stimolano anche la ricombinazione omologa, quindi l'introduzione di un "*template*" che possa ricombinare con la sequenza target, e portare alla sostituzione mirata di un singolo nucleotide. La co-espressione di Cas9 e di molteplici sgRNA porta alla generazione di mutazioni multiple in un unico passaggio (Cong et al., 2013; L. a Gilbert et al., 2013). Cas9 può avere il ruolo di repressore o attivatore dell'espressione genica, in cellule di mammifero o batteriche, tramite la mutazione dei siti attivi dei domini nucleasici RuvC e HNH, guidata da RNA (dCas9) ed essere convertita in una proteina di legame al doppio filamento di

DNA. La funzione di repressore si esplica sia mediante il legame diretto della dCas9 sulla sequenza del promotore per bloccare l'attività dell'RNA polimerasi, sia legandosi su sequenze all'interno degli *open reading frame* (ORF) bloccando l'allungamento della trascrizione (Bikard et al., 2013). L'attivazione dell'espressione genica richiede la fusione della dCas9 con degli attivatori trascrizionali, come ad esempio il dominio p65 (L. a Gilbert et al., 2013). Una delle applicazioni della tecnologia CRISPR/Cas9 è lo screening funzionale genomico *high-throughput*. Una libreria di centinaia di migliaia di sgRNA viene usata in combinazione con Cas9 al fine di abbattere, reprimere o attivare sistematicamente i geni su larga scala consentendo, ad esempio, l'identificazione di geni o degli elementi regolatori responsabile della crescita cellulare e della resistenza ai farmaci. La capacità del sistema CRISPR/Cas di editing genetico in una sequenza specifica, in sinergia alla disponibilità d'informazioni genetiche sulle malattie umane, ha portato alla generazione di sistemi *in vitro* e *in vivo* che permettono la modellizzazione e lo studio funzionale di molte malattie genetiche complesse come il cancro. La tecnologia CRISPR/Cas9 è utilizzata per la generazione di modelli cellulari e animali adatti a studiare mutazioni genetiche o aberrazione riscontrate nei pazienti. In letteratura sono presenti numerosi studi sulle Cellule Staminali Pluripotenti Indotte (iPSC) modificate da CRISPR, su modelli di varianti genetiche in diversi tessuti umani utilizzando il sistema delle colture cellulari (Hockemeyer & Jaenisch, 2016; Yu Zhang et al., 2016). Per la generazione di modelli cellulari Cas9, sgRNA e ssODN per HDR possono essere facilmente introdotti nelle cellule bersaglio utilizzando la trasfezione transiente dei plasmidi.

Il sistema CRISPR/Cas9 può essere applicato anche *in vivo*, per generare modelli animali geneticamente modificati, cruciali per lo studio dei processi cellulari e pato-fisiologici. Ad oggi, l'approccio del gene-editing mediante CRISPR/Cas9 è applicato non solo nei topi ma in molti altri modelli animali, poiché fornisce un approccio più semplice per ottenere animali transgenici. Gli acidi nucleici che codificano per la proteina Cas9, specifici per target sgRNA, possono essere iniettati direttamente in zigoti fertili e generare animali modificati geneticamente (L. A. Gilbert et al., 2014; P. D. Hsu et al., 2014; Maeder et al., 2013). È possibile bypassare la fase di targeting delle cellule Embrionali Staminali (ES) riducendo drasticamente il tempo necessario per la generazione

di animali mutanti. Visto l'enorme potenziale della tecnologia CRISPR/Cas9, lo step successivo è la sua applicazione ai fini terapeutici. Ad esempio, la medicina Rigenerativa ha l'obiettivo di sostituire le cellule necrotiche o malate con quelle sane. Uno dei possibili approcci è la terapia cellulare, in cui le cellule primarie sono manipolate geneticamente, per essere impiantate nei pazienti per curare la malattia. Il sistema CRISPR/Cas è utilizzato per correggere diversi danni genetici associate a malattia in una varietà di patologie umane compresa la distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e l'emofilia, la fibrosi cistica e beta talassemia (Firth et al., 2015; H. L. Li et al., 2015; Niu et al., 2016; Park et al., 2015).

Il CRISPR può essere utilizzato, non solo per scopi correttivi, ma anche per ottenere "cellule terapeutiche ingegnerizzate". La tecnologia CRISPR/Cas9 sta guidando una rivoluzione sia nella ricerca che nella terapia, presenta le potenzialità per rivoluzionare la terapia delle malattie umane, consentendo la correzione di malattie genetiche che causano, ad esempio, aberrazioni. In una recente sperimentazione clinica, un gruppo di ricerca dell'Ospedale West China, ha impiegato per la prima volta l'approccio CRISPR/Cas9 su pazienti affetti da tumore al polmone metastatico (NSCLC). Le cellule immunitarie del sangue, prelevate dai pazienti, prima di essere re-infuse sono state modificate ex-vivo per silenziare il gene PD-1 (programmed cell death 1). L'obiettivo della sperimentazione clinica è di migliorare la risposta immunitaria delle cellule contro il cancro. L'applicazione terapeutica di CRISPR-Cas9 potrà rappresentare un nuovo paradigma in *target therapy*, non prima del vaglio della questione etica. Il sistema CRISPR/Cas9 trova applicazione anche a livello industriale, nello specifico nella difesa dalle infezioni da parte dei virus, e ricopre un ruolo importante nella produzione di enzimi e farmaci (Barrangou & Horvath, 2012).

### **1.5.3 CRISPR/Cas9: limiti e problemi**

CRISPR/Cas è una tecnologia dotata di semplicità ed efficienza, sono peculiarità che hanno permesso di diventare un *tool* molto utilizzato per l'editing genomico, ma la sua applicazione presenta dei limiti. È necessario porre l'attenzione su determinati aspetti metodologici, prima di procedere al suo utilizzo. Il Cas9 e sgRNA sono utilizzati per avere un efficiente riconoscimento e taglio del sito target, ma, la contemporanea introduzione in un sistema biologico, risulta essere maggiormente complicata rispetto alla introduzione della singola componente.

Per ovviare al problema, si usano differenti approcci per la trasfezione di entrambe le componenti, come l'elettroporazione o l'utilizzo di agenti chimici e virali, in base alle cellule o al tipo di organismo utilizzato, l'importante è raggiungere il livello soglia (70%) di efficienza di trasfezione delle cellule totali (Jacobi et al., 2017; Liang et al., 2015; Zuris et al., 2015). Un altro problema riguarda la selezione del sito target e il disegno di sgRNA, poiché ogni sequenza di DNA può essere un potenziale sito target della sequenza 5'-NGG-3', ed essere contenuta ovunque nel genoma, è fondamentale la progettazione di sgRNA per limitare i legami aspecifici. Infine, il Cas9 induce mutazioni sia nelle regioni target che nelle regioni off-targets, per questo è necessario valutare l'effetto di queste mutazioni non volute.

Alcuni studi, sui potenziali effetti degli off-targets, hanno mostrato che i *mismatch* presenti all'estremità 5' del sito target sono meglio tollerati rispetto a quelli presenti nella "*regione seed*", che si trova 8-12 bp a monte della sequenza PAM, essenziale per il riconoscimento della sequenza complementare. Per ridurre il numero di *off-targets*, nel corso degli anni sono stati sviluppati, dei *tools* bioinformatici che forniscono un aiuto nella scelta e nel disegno di sgRNA, grazie ad analisi *in silico* che predicono il numero e la localizzazione dei possibili *off-target*. Possono essere utilizzate una serie di strategie, come ad esempio, la selezione di un sito target dove il contenuto di GC è maggiore del 70%, poiché aumenta l'ibridazione e la tolleranza verso i *mismatch*, mentre se la percentuale di GC è inferiore al 30% si osserva un elevato numero di *off-target* (Lin et al., 2014). In alternativa è possibile ridurre la concentrazione del Cas9 e di sgRNA, o troncatura l'sgRNA al 3' del tracrRNA, e aggiungere due GG extra all'estremità 5' a valle della regione complementare (Pattanayak et al., 2013). Un'altra opzione è quella di creare un sgRNA troncato all'estremità 5' della regione *protospacer* affinché la sequenza complementare sia di 17-18 bp, ed aumenta la specificità (Fu et al., 2014; Zalatan et al., 2015).

## 2 SCOPO DEL LAVORO

La teoria delle CSCs allarga le prospettive nella comprensione dei meccanismi di resistenza sviluppati dai tumori sostenendo l'esistenza di una sottopopolazione di cellule neoplastiche all'interno del cancro con caratteristiche simil staminali, in grado di originare e promuovere la progressione tumorale, (Eramo et al., 2010; Mancini et al., 2018; Pattabiraman & Weinberg, 2014; Pisanu et al., 2017). Le crescenti evidenze che la sottopopolazione di CSCs presente nelle neoplasie sia resistente ai convenzionali trattamenti chemioterapici e radioterapici identifica nelle stesse la causa della recidiva della malattia osservata nei pazienti (Eramo et al., 2010).

Comprendere i meccanismi che sostengono la crescita e la proliferazione delle CSCs risulta fondamentale nell'identificazione di terapie efficaci per il trattamento dei tumori. Questi studi sono limitati dal fatto che le putative CSCs sono presenti in quantità minime in un dato tessuto tumorale e proliferano lentamente. Inoltre, molto spesso la porzione del tumore dalla quale è possibile allestire culture primarie per l'isolamento delle putative CSCs è insufficiente. A tal proposito, nuovi approcci metodologici utilizzano i *MPEs* per isolare e amplificare le CSCs, consentendoci di ampliare le conoscenze sul NSCLC (Basak et al., 2009).

### 2.1 Background

Lo scenario in cui si colloca il presente lavoro è quello del gruppo di ricerca da anni impegnato nell'isolamento e caratterizzazione di CSCs di adenocarcinoma polmonare. È stato ottimizzato un protocollo adatto all'allestimento di colture cellulari primarie da versamento pleurico di pazienti affetti da adenocarcinoma del polmone.

La ragione, che ha guidato la scelta di questo sistema biologico, è di ottenere una bio-banca in grado di fornire le informazioni necessarie per creare una terapia personalizzata. Alcune linee cellulari primarie hanno la capacità di formare degli sferoidi (3D) con caratteristiche simil-staminali.

È stata effettuata la comparazione dei profili di espressione genica per identificare una serie di geni differenzialmente espressi tra le cellule cresciute in aderenza e gli sferoidi, tra questi, il gene codificante per l'enzima SCD1 (Mancini et al., 2011). SCD1 è coinvolto nell'attivazione della biosintesi lipidica, in

particolare la sintesi *de novo* degli acidi grassi, che rappresenta uno dei principali eventi metabolici alla base della trasformazione tumorale (Mancini et al., 2018).

In studi precedenti, è stato dimostrato che l'inibizione di SCD1 in cellule sferoidi derivati da *MPEs*, determina una diminuzione della capacità di formazione delle cellule 3D e dell'espressione dei principali marcatori di staminalità (Noto et al., 2013). Considerando i risultati ottenuti nel corso degli anni è stato possibile considerare il ruolo di SCD1 nel regolare la sopravvivenza di CSCs di adenocarcinoma polmonare.

Data la complessità della funzione di SCD1 nella staminalità si è deciso di affrontare l'argomento studiando il meccanismo regolatore sia nel a valle mediante il coinvolgimento del pathway di Hippo, che a livello trascrizionale mediante lo studio del promotore del gene.

## **2.2 Scopo del lavoro (I° parte)**

Lo scopo della prima parte del progetto di Dottorato è d'indagare il meccanismo molecolare attraverso cui SCD1 regola la sopravvivenza delle CSCs di adenocarcinoma polmonare. Recentemente è stato riportato come l'attività di SCD1 sia coinvolta nell'attivazione del *pathway* di *Wnt/β-catenina*, dunque ipotizziamo che SCD1 potrebbe interferire con altre vie che sono notoriamente deregolate nel cancro, come il *pathway* di Hippo (Rios-Esteves & Resh, 2013).

Numerosi studi evidenziano come il *pathway* di Hippo, in particolare i suoi effettori YAP e TAZ, rappresentano un elemento cruciale nello sviluppo delle neoplasie. L'attività di YAP e TAZ è stata recentemente correlata alla regolazione di meccanismi alla base della carcinogenesi: generazione di CSCs, EMT, metastatizzazione (Azzolin et al., 2014; Cordenonsi et al., 2011; S. Piccolo et al., 2014; Yeung, Yu, & Yang, 2016).

Utilizzando come modello di studio linee cellulari primarie derivanti da *MPEs*, ed una linea stabile di adenocarcinoma polmonare, NCI-H460, cresciute sia in condizioni di 2D che 3D. Ci si propone sia di valutare l'attività di YAP e TAZ nell'adenocarcinoma polmonare ed il loro coinvolgimento nel regolare la sopravvivenza delle CSCs; sia di determinare se la loro attivazione è regolata a monte dall'attività di SCD1.



### 2.3 Scopo del lavoro (II° parte)

Nella prima parte del progetto di Dottorato sono stati approfonditi i meccanismi a valle attraverso il modulo trascrizionale di YAP/TAZ; nella seconda parte il focus viene spostato verso l'identificazione dei Fattori Trascrizionali che potrebbero regolare SCD1 a monte, ossia nella regione del promotore. Studi condotti sulla regolazione trascrizionale sostengono l'importanza assunta dai TFs, SREPB1, c-MYC, NF-Y e NF-kB, nell'ambito delle alterazioni del metabolismo lipidico nei processi di tumorigenesi (Benatti et al., 2016; Y. Wu et al., 2016).

I suddetti TFs potrebbero agire in maniera indipendente o creare delle interazioni in grado di formare un *network* capace di regolare l'attività trascrizionale nel passaggio da cellule in adesione a sferoidi, arricchite di CSCs, nell'adenocarcinoma del polmone. Ci si propone di identificare i TFs che legano il promotore di SCD1, e di effettuare la mutagenesi della regione del promotore al fine di identificare la porzione più piccola con maggiore efficienza trascrizionale nel passaggio da cellule 2D a 3D.

La mutagenesi è effettuata mediante il sistema CRISPR/Cas9 al fine di ottenere linee cellulari isogeniche che differiscano per una porzione di promotore in cui legano i fattori trascrizionali individuati, nella linea stabile NCI-H460 di adenocarcinoma del polmone.

### **3 MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Colture Cellulari**

##### **3.1.1 Linee cellulari primarie da versamento pleurico**

Le colture cellulari primarie sono state allestite da versamenti pleurici maligni (MPEs) di pazienti affetti da adenocarcinoma polmonare, afferenti al Dipartimento di Chirurgia Toracica e Pneumologia dell'Ospedale Sant'Andrea di Roma, sia dell'Università degli studi di Roma "La Sapienza", sia dall'Istituto Tumori Regina Elena (IFO). La raccolta dei MPEs avviene per toracentesi, ogni singolo campione è consegnato al laboratorio e processato seguendo un protocollo ottimizzato nel nostro laboratorio (Mancini et al., 2011). I MPEs presentano un volume compreso tra 50-1500 ml, un aspetto più o meno ematico e/o ricco in fibrina. Il liquido biologico viene stratificato sull'*OncoQuick* (Greiner Bio-One), che permette di ottenere la separazione della componente cellulare mediante un gradiente di densità discontinuo. La fase apicale contiene le cellule tumorali che vengono recuperate e piastrate in mezzo di coltura per la crescita in aderenza in RPMI (Sigma) al 10% di FBS (Gibco), 1% penicillina/streptomina (Sigma), 2 mM glutamina (Sigma) a 37°C in atmosfera addizionata con il 5% di CO<sub>2</sub>. (Mancini et al., 2011; Noto et al., 2013). Le linee primarie isolate da versamento pleurico utilizzate in questa tesi sono: Pe o/11, Pe 2/15, Pe 4/15, Pe 5/15 (A. Noto et al., 2017). Il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera Sant'Andrea e dell'Istituto Nazionale Regina Elena (IRCSS-IFO), ciascun soggetto ha fornito il proprio consenso informato per l'utilizzo dei versamenti pleurici.

##### **3.1.2 Linee Cellulari Stabili**

Le linee stabili di adenocarcinoma del polmone utilizzate sono state acquistate dall'American Type Culture Collection (ATCC) e sono le seguenti: NCI-H460 (ATCC HTB-177), NCI-H1975 (ATCC CRL-5908), NCI-H1299 (ATCC CRL-5803) e HEK293T (ATCC-CRL-3216). Le cellule vengono tenute in coltura sia in condizioni di aderenza che in sospensione, come le linee primarie derivanti da versamento pleurico.

##### **3.1.3 Linee cellulari in coltura in 3D**

Le linee primarie e stabili di adenocarcinoma del polmone, nel momento in cui la

coltura in aderenza cresce esponenzialmente, viene selezionata la coltura in 3D. Le cellule sono seminate ad una concentrazione di 10-15.000 cellule/ml, in flasche *Ultralow Attachment* (Corning), in un terreno selettivo per la crescita in sospensione chiamato *Sphere Medium*. La coltura in sospensione consente di ottenere cellule in 3D dopo 4 giorni, incubando le flasche a 37°C in atmosfera arricchita al 5% di CO<sub>2</sub> (Mancini et al., 2011; Noto et al., 2017, 2013, Pisanu et al., 2014, 2017; Roscilli et al., 2016).

### 3.2 Saggi di vitalità e trattamenti farmacologici

Il saggio di vitalità delle cellule cresciute in condizioni di 2D viene quantificata mediante un saggio di tipo colorimetrico usando l'*MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide* (Sigma Aldrich). Le cellule sono seminate in un numero dipendente dalla linea cellulare, in piastre da 96 pozzetti con RPMI 10% FBS. La vitalità cellulare viene misurata dopo 72 ore di trattamento, aggiungendo la soluzione MTT ad una concentrazione di 5mg/ml in ogni pozzetto, e misurata utilizzando il lettore ELISA (*Thermo Scientific*). È stato eseguito il saggio clonogenico, in cui le cellule sono state seminate in piastra da 12 pozzetti a bassa concentrazione e trascorse 96 ore, il terreno è stato rimosso, i pozzetti sono stati lavati ed è stato aggiunto il colorante cristal violet (*Fisher Scientific*). Dopo 10 minuti di incubazione, il colorante è stato rimosso e le piastre sono state lavate con acqua corrente demineralizzata. Per determinare la capacità di autorinnovamento delle cellule in 3D viene effettuato il saggio di formazione di sferoidi, le cellule sono seminate a una densità di 1500/2000 cell/pozzetto in piastre *Ultralow attachment* da 96 pozzetti in *Sphere Medium*. L'efficienza di formazione delle cellule in 3D, espressa in percentuale, viene stabilita dal rapporto delle singole cellule piastrate con il numero di sferoidi formati dopo il periodo di incubazione (7 giorni). Il quoziente viene moltiplicato per 100. Mentre, la vitalità cellulare viene misurata utilizzando il *CellTiter -Glo 3D Cell Viability Assay* (Promega), e rilevata in proporzione alla quantità di ATP presente nelle cellule. La lettura della luminescenza emessa nella reazione è effettuata tramite il luminometro *Glomax Explorer System* (Promega). La determinazione del IC<sub>50</sub> (concentrazione inibente del 50%) le cellule sono trattate con l'inibitore di SCD1 (MF438) a diluizioni seriali (da 50 µM a 0,007 µM). Per altri esperimenti le cellule sono state tenute in coltura in presenza o in assenza di MF438 (1 µM) per 48

ore, e analizzati per misurare l'attività di ALDH1A1, analisi di Western Blotting, (WB), Real Time PCR (RT-PCR), Immunofluorescenza (IF) e FACS Analysis. Gli esperimenti vengono eseguiti in triplicato, quindi ciascun campione viene valutato ed analizzato in tre esperimenti indipendenti (Ciardiello et al., 2016; Noto et al., 2013; Pisanu et al., 2017; Roscilli et al., 2016).

### **3.3 La Citofluorimetria (FACS analysis)**

La citofluorimetria è stata utilizzata per misurare l'attività enzimatica dell'Aldeide Deidrogenasi (ALDH1A1) marker candidato per le cellule staminali tumorali di adenocarcinoma del polmone (Mancini et al., 2011; Noto et al., 2013; Jinhan Wang et al., 2017). L'attività di ALDH è stata analizzata con il Kit Aldefluor (Stem Cell Technologies) in base alle istruzioni del produttore. Le cellule cresciute in 2D e in 3D ( $0,5-1.0 \times 10^6$ ) vengono incubate con il substrato ALDEFLOUR (BODIPY-aminoacetaldeide (BAAA)) in presenza o meno dell'inibitore specifico ALDH (dietilamminobenzaldeide (DEAB)), usato come controllo negativo. Le cellule risospese in tampone ALDEFLOUR, BAAA e DEAB sono utilizzate per stabilire la fluorescenza basale e definire la regione ALDEFLOUR positiva. L'analisi del ciclo cellulare viene effettuata marcando le cellule con propidio Ioduro ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) che si lega proporzionalmente alla quantità di DNA presente nelle cellule, precedentemente fissate e permeabilizzate. I dati di citofluorimetria sono acquisiti utilizzando un Coulter XL EPICS (Beckman-Coulter). Il saggio di apoptosi viene effettuato con Muse Annexin V (Millipore), per determinare le fasi precoci, e con il kit Dead Cell Assay (Millipore) per misurare la citotossicità delle cellule trattate negli esperimenti, secondo le istruzioni del produttore. Inoltre, sono state valutate le specie sottoposte a stress ossidativo in base alla rilevazione di radicali superossido (ROS) intracellulari, utilizzano il kit Oxidative Stress Muse (Millipore), nelle popolazioni cellulari. Entrambi i saggi sono stati analizzati con il Muse Cell Analyzer (Millipore) (Noto et al., 2017; Pisanu et al., 2014, 2017).

### **3.4 Tecniche di Immunochimica**

#### **3.4.1 Il Western Blot (WB)**

Il Western blot (WB), è una tecnica comunemente utilizzata per il rilevamento delle proteine di interesse. Le cellule in 2D e in 3D ( $0,5-1.0 \times 10^6$ ) sono lisate in *RIPA Lysis Buffer* (Sigma Aldrich) addizionato con inibitori di proteasi e fosfatasi

(Roche). Per ogni campione è utilizzata una quantità di 25-30 µg di estratto proteico totale. La separazione delle proteine avviene per SDS-PAGE in un gel precostituito, *Bolt Bis-Tris Plus Gel* (Invitrogen), le proteine sono trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa utilizzando l'*iBlot Dry Blotting System* con il kit *iBlot Transfer Stack* (Invitrogen). Le membrane sono incubate overnight a 4°C in agitazione con gli anticorpi primari, e il giorno seguente, con l'anticorpo secondario coniugato con *HPR* (*Horse Radish Peroxidase*). I complessi antigene-anticorpo sono analizzati mediante una reazione di chemiluminescenza, incubando la membrana con una soluzione di *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham). Il rilevamento digitale del segnale chemiluminescente viene visualizzato mediante lo strumento Azure c300. La valutazione delle intensità delle bande è effettuata attraverso l'analisi densitometrica utilizzando il software *ImageJ*, ogni segnale viene normalizzato rispetto all' $\alpha$ -tubulina, alla GAPDH o alla Vinculina (Noto et al., 2017, 2013).

#### **3.4.2 Immunofluorescenza (IF)**

L'immunofluorescenza (IF) è stata effettuata in cellule in 2D e in 3D. Le cellule sono fissate in paraformaldeide (PFA) al 4%, permeabilizzate con 0.1% Triton-X100 (Sigma Aldrich) e incubate con l'anticorpo primario specifico. Le immagini sono state visualizzate utilizzando un microscopio invertito (Nikon, Tokyo, Japan), fotografate tramite Axiocam Camera (Zeiss) ed analizzate usando lo ZEN core software (Zeiss, Gottingen, Germany). La determinazione delle cellule positive per uno specifico antigene è stata ottenuta contando per ogni trattamento un totale di almeno 300 cellule, osservate in dieci campi microscopici scelti casualmente, in tre differenti esperimenti (Noto et al., 2017; Pisanu et al., 2017; Sorrentino et al., 2014).

#### **3.4.3 Immunoistochimica (IHC)**

L'immunoistochimica è stata effettuata su sezioni in paraffina di adenocarcinoma del polmone da paziente, al fine di valutare l'espressione fenotipica di SCD1 (clone CD.E10 Abcam), di  $\beta$ -catenina (clone  $\beta$ -catenin-1 Dako) e di YAP/TAZ (clone 63.4 Santa Cruz) (Noto et al., 2017). Tutti i casi studiati sono stati ottenuti mediante consenso informato.

### 3.5 Metodi di analisi dell'RNA

#### 3.5.1 Estrazione di RNA e Real Time quantitative PCR (RT-PCR)

L'RNA totale di cellule cresciute in 2D e in 3D è stato estratto utilizzando il TRIzol (Thermofisher), secondo le istruzioni del produttore. L'RNA totale è stato quantizzato tramite fluorimetro *Qubit 2.0 Fluorometer* (Thermofisher) utilizzando gli appositi kit *Qubit RNA BR(Broad Range)* e *HS (High Sensitivity) Assay Kits*. 1 µg di RNA totale è stato trattato con gDNA (TAKARA) per eliminare la contaminazione da DNA, e retrotrascritto utilizzando il kit *TAKARA*, secondo le istruzioni del produttore. I cDNA (20 µg) sono stati utilizzati per quantizzare l'espressione dei geni d'interesse tramite Real Time PCR, utilizzando come sistema di rilevazione il *SYBR Select Master Mix* (Applied Biosystem). La reazione di amplificazione ottenuta con l'utilizzo della macchina *Step One System* (Applied Biosystem) e gli oligo sono descritti nella Tabella 1. L' H3 è stato usato come normalizzatore e l'espressione relativa di ogni gene è stata determinata utilizzando il metodo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Ogni esperimento è stato ripetuto almeno tre volte (Noto et al., 2017; Pisanu et al., 2017; Ricci et al., 2013).

### 3.6 Trasfezioni per silenziamento genico

La trasfezione di linee primarie e stabili, prevede che le cellule vengono seminate in condizione di aderenza, in terreno privo di antibiotici. Il protocollo di silenziamento genico prevede l'uso del siRNA costituiti da un pool di siRNA di 19-25 nucleotidi; dal siRNA-A di controllo detto *scramble* (sc-37007; Santa Cruz) e il reagente lipofectamina 2000 (Invitrogen), secondo le istruzioni del produttore. In ciascuna condizione sperimentale, viene transfettata una quantità di 75 pmoli di siRNA, ognuna contenente 7.5 µl di *Lipofectamine 2000* (Invitrogen), su piastre da 6 pozzetti. Trascorse 24 ore dalla trasfezione, una parte delle cellule viene staccata, contata e messa in condizioni di coltura in 3D. I siRNA utilizzati nella prima parte sono descritti in Noto et al, 2017 (Noto et al., 2017). Gli esperimenti di silenziamento genico effettuati nella seconda parte del progetto sono i seguenti: SREPB1 siRNA (h) sc-36557; NF-YA siRNA (h) sc-29947; NF-YB siRNA (h) sc-29945 e c-MYC siRNA (h) sc-29226 (santa cruz). L'efficienza del silenziamento genico viene valutata misurando la riduzione dei livelli di mRNA di interesse attraverso RT-PCR (Noto et al., 2017; Pisanu et al., 2017; Sorrentino et al., 2014).

### **3.7 Analisi degli ACIDI GRASSI (FAMES)**

La composizione degli acidi grassi è possibile valutarlo attraverso il FAME (estere metilico di acidi grassi) in cui vengono utilizzati due procedimenti diversi di metilazione. Le cellule analizzate sono processate secondo il metodo standard basato sulla saponificazione dei lipidi, metilazione degli acidi grassi e analisi del gas cromatografia/spettrometro di massa (Lepage & Roy, 1984). L'identificazione dei FAMES è ottenuta confrontando gli spettri di massa dei campioni analizzati e quelli presenti nelle 275 librerie Wiley. È stata calcolata la percentuale relativa di ogni componente in base al picco delle GC (Noto et al., 2017).

### **3.8 Microscopia confocale e elettronica**

Il microscopio confocale Leica (Laser Scanning TCS SP2) munito di laser HeNe e Ar/ArKr è stato utilizzato per acquisire le immagini. Le immagini delle cellule in 3D sono state scansionate con un obiettivo 40x, per analizzare l'intero corpo dello sferoide sono acquisite 10 fotogrammi lungo l'asse z a distanza di 1  $\mu\text{m}$ . Le immagini sono state analizzate con il software confocale Leica. L'analisi di microscopia elettronica è stata effettuata su cellule in 3D fissate con glutaraldeide al 2,5% in 0,1 M di cacodylate buffer (pH 7.4) incorporato in resina epossidica. Le sezioni sono state colorate con blu di Toluidina, trattate con acido tannico e contro-colorate con idrossido di piombo. I campioni sono stati fotografati con un microscopio elettronico a trasmissione Hitachi 7000 (Tokyo, Giappone) (Noto et al., 2017).

### **3.9 Saggi per lo studio delle interazione tra DNA e proteine**

#### **3.9.1 Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)**

In collaborazione con il laboratorio del Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin" della Sapienza, è stata effettuata l'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP). La ChIP permette di individuare i legami specifici tra le proteine e specifiche regioni del DNA, nello specifico il legame dei fattori trascrizionali sul promotore di SCD1, utilizzando il kit MAGnify Chromatin Immunoprecipitation System (Life Technologies), secondo le indicazioni del produttore. Le cellule provenienti dalla linea di adenocarcinoma del polmone NCI-H460 ( $1 \times 10^6$ ), in condizioni di coltura in 2D e 3D, sono state fissate

direttamente nel terreno di coltura con formaldeide all'1% che permette di convertire in legami covalenti le interazioni deboli tra i fattori trascrizionali e DNA genomico. Le cellule in condizioni di 2D e 3D sono sonicate, ossia mediante l'utilizzo di ultrasuoni la cromatina viene frammentata in dimensioni di 200-500 paia di basi. La cromatina viene controllata su gel di agarosio al 2% e suddivisa in tre aliquote: una parte di DNA totale rappresenta l'Input control, che non viene immunoprecipitata; una parte è immunoprecipitata *overnight* a 4° C in presenza dell'anticorpo primario specifico che riconosce la proteina di interesse la restante aliquota è il controllo negativo. La specificità della reazione di immunoprecipitazione è verificata attraverso l'allestimento del controllo negativo, realizzato attraverso l'immunoprecipitazione di un anticorpo diretto verso una proteina che non è associata alla cromatina nel sito di interesse. A tale scopo viene utilizzato l'anticorpo anti-IgG (immunoglobulina G). Al termine dell'immunoprecipitazione, al fine di recuperare il DNA si effettua il reverse cross-linking, mediante incubazione a 65°C, e la digestione con la Proteinasi K delle proteine cromatiniche associate al DNA. Il DNA purificato viene analizzato mediante PCR quantitativa per misurare l'arricchimento cromatinico del DNA target.

### **3.9.2 Quantitative Real Time PCR (RT-qPCR)**

Il DNA purificato, ottenuto dagli esperimenti di ChIP, è stato analizzato mediante qPCR utilizzando la SYBR green PowerUp Master Mix (applied) con lo strumento StepOne dell'Applied Bioscientific. L'amplificazione dei complessi di DNA immunoprecipitato avviene solo se la proteina, target dell'anticorpo utilizzato, viene legata alla cromatina nell'immunoprecipitazione. Per l'analisi delle regioni del promotore di SCD1 sono stati utilizzati gli oligonucleotidi che amplificano le 5 regioni di interesse e la regione intergenica (IR) selezionata sulla porzione telomerica del cromosoma 10 (chr10:134795784-134796529) (Tabella 2). La specificità della reazione di immunoprecipitazione è stata verificata attraverso l'allestimento di un controllo negativo, realizzato attraverso l'immunoprecipitazione di un anticorpo diretto verso una proteina che non è associata alla cromatina nel sito di interesse. A tale scopo viene utilizzato l'anticorpo policlonale anti-IgG (immunoglobulina G).



### 3.10 Costruzione del vettore pSpCas9-sgRNA

In collaborazione con il CROM (Centro di Ricerca Oncologica di Mercogliano) è stato costruito il vettore pSpCas9n(bb)-2a-puro, o px459 di 9200 bp. Il plasmide presenta: hU6 promoter che permette di esprimere RNA piccoli come le sgRNA; la resistenza all'antibiotico Ampicillina necessario per la selezione delle colonie avente il vettore; diversi siti di restrizione; la resistenza all'antibiotico Puromicina per selezionare le cellule contenenti il plasmide. Il vettore px459 contiene il gene codificante l'endonucleasi Cas9 cui è stato legato i sgRNA, precedentemente predetti *in silico* attraverso degli strumenti di bioinformatica in grado di identificare i possibili *off-target* individuati dal sgRNA. È stato utilizzato il sistema adatto per ottenere la sequenza complementare sgRNA. È stato utilizzato il protocollo del laboratorio Zhang (*Target sequence cloning Protocol*) per disegnare gli oligonucleotidi che costituiscono la sequenza sgRNA al fine di procedere con il clonaggio nel vettore pSpCas9n(bb)-2a-puro. Delle sequenze specifiche vengono aggiunte ai sgRNA, (CACCG al 5' del Foward e CAAA al 5' del Reverse) utilizzate in un secondo momento per effettuare un clonaggio con l'enzima di restrizione *BbsI* (NEB) nel plasmide pSpCas9n(bb)-2a-puro. I nucleotidi formanti le sgRNA sono stati disegnati consultando il sito [crispr.mit.edu](http://crispr.mit.edu) e sono stati selezionati i seguenti ( Tabella 3) (i nucleotidi in corsivo non sono forniti dal *Target sequence cloning Protocol*). Inoltre, il protocollo prevede la digestione del vettore e il successivo clonaggio di sgRNA nel vettore. La preparazione della soluzione di digestione del vettore px459 (20 µl) comprende:

1 µg di Plasmide px459

1 µl FastDigest*BbsI*

1 µl FastAP

2 µl 10X FastDigest Buffer

x µl ddH<sub>2</sub>O

La soluzione viene incubata per 10 minuti a 37°C, e in seguito a 65°C per 15 minuti al fine di inattivare l'enzima di restrizione *BbsI*. La digestione del plasmide viene corsa su un gel di agarosio all'1%, comparato con un Ladder 1Kb e quantizzata mediante il fluorimetro *Qubit Fluorometer 2.0* (Invitrogen). Lo step seguente prevede l'appaiamento degli oligonucleotidi, costruiti per ciascuna

guida nel passaggio iniziale, la soluzione per la fosforilazione e appaiamento degli oligonucleotidi (20  $\mu$ l) contiene anche il plasmide vuoto e prevede i seguenti reagenti:

1  $\mu$ l Forward sgRNA (100 mM)

1  $\mu$ l Reverse sgRNA (100 mM)

1  $\mu$ l 10X T4 Ligation Buffer (NEB)

6.6  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

0.5  $\mu$ l T4 PNK (NEB)

La soluzione viene incubata nel termociclatore a 37°C per 30 minuti, a 95°C per 5 minuti, e poi si riduce di 5°C/secondo fino a raggiungere 25°C. Nel momento in cui è terminata la digestione del vettore px549 ed è avvenuta la formazione dell'homoduplex degli oligonucleotidi si procede con il clonaggio del plasmide preparando la *mix* (11  $\mu$ l) contenente:

X  $\mu$ l di Plasmide px459 digerito con *Bbs*I (50ng)

1  $\mu$ l oligonucleotidi appaiati e fosforilati (diluiti 1:200)

5  $\mu$ l 2X Quickligation Buffer (NEB)

X  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

1  $\mu$ l QuickLigase (NEB)

La soluzione viene incubata per 10 minuti a temperatura ambiente. Lo step successivo prevede la trasformazione delle cellule competenti Stbl3 (NEB) in terreno LB (Luria-Bertani), precedentemente autoclavato e addizionato dell'antibiotico Ampicillina (0.1 mg/ml). Avvenuta la trasformazione, le cellule batteriche contenente il plasmide sono piastrate in piastre con terreno selettivo di LB-agar e Ampicillina e sono incubate a 37°C per circa 12 ore. Le colonie batteriche in grado di crescere sulla piastra contenente l'antibiotico, sono quelle che hanno integrato il plasmide con il gene che conferisce resistenza all'Ampicillina. Dalle piastre batteriche si selezionano 10-15 colonie batteriche, contenente presumibilmente il vettore con sgRNA, da cui viene estratto il DNA plasmidico passando per i mini-inoculi per la MidiPrep (ThermoFisher) secondo le istruzioni del produttore. Al termine dell'estrazione il plasmide estratto viene fatto correre su gel al'1%, affinché si rilevi la sua presenza con i giusti valori e si effettua la quantizzazione con il fluorimetro *Qubit*.

### **3.10.1 Trasfezione dei mutanti nella linea stabile di adenocarcinoma del polmone**

La trasfezione permette di introdurre DNA esogeno all'interno di linee cellulari in coltura, e per facilitare l'ingresso del vettore si utilizza l'agente trasfettante lipofectamina 2000 (Life Technologies), costituito da nano-particelle lipidiche che si complessano con il DNA da veicolare. Il protocollo di trasfezione per il sistema CRISPR/Cas9 prevede che siano piastrate le cellule ( $1,2 \times 10^6$ ) in dish da 10 cm. Per ogni trasfezione sono stati utilizzati 4  $\mu\text{g}$  di DNA plasmidico (2  $\mu\text{g}$  di plasmide per un approccio a doppia guida). Dopo 48 h dalla trasfezione, le cellule sono state splittate 1:5 (diluizione di clonazione) per essere sottoposte a selezione con puromicina (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Il terreno di coltura di selezione è stato sostituito ogni 3 giorni fino alla comparsa di colonie visibili (circa 15-20 giorni). I cloni sono stati amplificati per successive analisi.

### **3.10.2 Screening delle colonie e verifica della mutagenesi**

Le colonie cresciute in terreno con puromicina, resistenti all'antibiotico di selezione, hanno integrato il plasmide, hanno subito l'azione del vettore Cas9 che dovrebbe aver effettuato il taglio della porzione di promotore di interesse. Il DNA genomico è estratto dai cloni stabili ottenuti dalla trasfezione con Genomic DNA MiniKit (Geneaid). Il DNA viene quantizzato con Qubit (applied) per eseguire la PCR con DNA polimerasi ad alta fedeltà (ROCHE) secondo le istruzioni del produttore. Sono state disegnate le coppie di primers utilizzate per la verifica su DNA genomico in modo che comprenda l'intera sequenza del promotore. Le cellule in cui si è verificata la mutagenesi presentano un prodotto di PCR inferiore rispetto al *WT*. I primers per PCR sono elencati nella Tabella 3. I prodotti di PCR vengono corsi su gel di agarosio all'1% e viene eseguito il sequenziamento genico (BioFab).

## **3.11 Analisi genomica funzionale**

### **3.11.1 ATAC-seq**

L'analisi di accessibilità di cromatina trasposta (ATAC-seq) è stata effettuata su cellule cresciute in condizione di 2D e 3D della linea stabile NCI-H460, a tal fine sono state contate e congelate 50.000 cellule per condizione di coltura. I pellet cellulari sono stati scongelati e risospesi in una soluzione "*transposase reaction mix*" addizionato del Tn5 (*Transposase*) e incubati per 30 minuti a 37°C, secondo

le istruzioni del produttore (Illumina). I passaggi successivi, eseguiti per ottenere le librerie, sono stati eseguiti secondo il protocollo descritto da *Nature Methods* (Buenrostro, Giresi, Zaba, Chang, & Greenleaf, 2013). Successivamente, le librerie vengono purificate con le biglie magnetiche Ampure XP, e la loro qualità viene controllata al *Bioanalyzer*. Ciascuna libreria viene accoppiata come doppia sequenza (2x 75bp) tramite lo strumento *NextSeq 500* (Illumina).

### 3.11.2 RNA-seq

L'RNA totale è stato estratto da cellule cresciute in condizioni di 2D e 3D derivanti dalla linea stabile NCI-H460 usando il Qiazol (Qiagen) e il kit di Qiagen RNeasy per la profilazione genica (Qiagen). Nelle fasi di estrazione su colonnine dell'RNA, è previsto un passaggio di digestione dell'RNA con la DNasi I (Qiagen) per purificarlo dalla contaminazione di DNA genomico. La quantità di RNA è stata valutata allo spettrofotometro Nanodrop (NanoDrop Technologies), e al Bioanalizzatore Agilent 2100 (Agilent Technologies). Le librerie di RNA per il sequenziamento sono state generate in triplicato secondo le istruzioni del kit Illumina *TruSeq Stranded*, quantificate con qPCR in *paired-end* (2 x 75 bp) con NextSeq 500 (Illumina). Per ciascun campione generato dalla piattaforma Illumina è stato eseguito un passaggio pre-processo per il controllo di qualità, allo scopo di valutare la qualità dei dati di sequenza e scartare a priori i campioni con bassa qualità di lettura.

### 3.11.3 Analisi bioinformatica

L'analisi bioinformatica per ATAC-seq è stata effettuata mappando le letture grezze con *Bowtie2* e i picchi/regione ATAC sono stati chiamati come MACS2. I parametri sono stati impostati come "no-model1", "shift-100", "extsize 200". I *bigwigs* sono stati generati con *pybedtools*, con la funzione "bam\_to\_bigwig". I dati RNA-seq sono stati analizzati grazie all'analisi *pipeline*, a Flusso di lavoro basato sulla suite *Tuxedo*. I picchi normalizzati ottenuti sono stati estratti dai conteggi grezzi HTseq ricavati dai risultati dell'analisi *pipeline* con il pacchetto DEseq2.

## 3.12 Analisi bioinformatica

L'analisi bioinformatica è stata eseguita utilizzando il *tool* online SynTarget per studiare l'effetto sinergico dei geni studiati e la sopravvivenza dal cancro

(<http://www.bioprofiling.de>), usando il set pubblico di dati GSE31210 (adenocarcinoma del polmone stadio I-II). Nello specifico sono stati utilizzati PPISURV per verificare che la lista dei geni studiati possono essere considerati biomarcatori nella sopravvivenza dal cancro; e GENESURV per verificare che i geni valutati sia anche statisticamente significativa (Noto et al., 2017; Pisanu et al., 2017). Al fine di identificare un putativo nuovo inizio della trascrizione, una regione di 1kb a monte del gene SCD1 c è stata sottomessa a vari motori di ricerca in grado di riconoscere elementi regolatori caratteristici dei promotori. In particolare sono stati usati:

- Promoter Scan v.1.7 (<https://www-bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/proscan>);
- [http://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna\\_search/](http://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna_search/)
- <https://gbiomed.kuleuven.be/apps/lcb/i>
- cisTarget/reports/a96382130082dcd924bef4936410039d4d778441/report.html

È stata inoltre eseguita, con il software MatInspector Professional di Genomatix (<http://www.genomatix.de>), una ricerca di siti di legame per specifici fattori di trascrizione nella regione di interesse.

### **3.13 Analisi statistica**

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato in maniera indipendente. Tutti i valori riportati nel testo e nelle figure rappresentano la media  $\pm$  SD o espressa in percentuale dei controlli  $\pm$  SD. La significatività statistica delle differenze osservate tra le medie è stata valutata tramite t-test a due code per dati non appaiati. I confronti di gruppo sono stati eseguiti da ANOVA o t-test di Student. Il metodo Kaplan Meier è stato utilizzato per stimare la sopravvivenza, e la differenza p stat confrontata utilizzando il test di log rank. I risultati sono considerati statisticamente significativi quando il p-value (p) < 0.05. I risultati con p<0.05 sono indicati con un asterisco (\*), quelli con p<0.01 con due asterischi (\*\*).

### **3.14 Anticorpi**

#### **3.14.1 Anticorpo per Immunoblot, IF e IHC**

Gli anticorpi primari utilizzati per FACS analysis, WB, IF e IHC sono stati descritti nei lavori pubblicati in Noto et al. (Noto et al., 2017). Per gli esperimenti della

seconda parte del progetto è stato utilizzato anche l'anticorpo Vinculina anti-mouse (Sigma-Aldrich, V9131) per Western Blot e l'anticorpo SCD1 anti-mouse (ab19862 abCam) per immunofluorescenza.

### 3.14.2 Anticorpi per ChIP

Per gli esperimenti di ChIP sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: SREBP1c anti- (santa cruz); cMYC anti-rabbit (sc764, santa cruz); Pol II antibody from Santa Cruz Biotechnology sc-899 (5 ug per IP); H3K4me3 anti-rabbit (17-614 Millipore); NF-kB anti- (non ricordo); NF-YA and NFYB anti- home made (gruppo di Mantovani). Gli anticorpi anti-Rabbit e anti-Mouse IgG sono stati usati come controllo negativo.

### 3.15 Oligonucleotidi

Gli oligonucleotidi utilizzati per la prima parte del progetto di Dottorato per RT-PCR sono stati descritti nei lavori pubblicati in Noto et al. (Noto et al., 2017, 2013; Pisanu et al., 2017). Inoltre, per la seconda parte del progetto sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi.

RT-PCR\_oligonucleotidi

| Oligonucleotidi  | Sequenza (5'-3')               |
|------------------|--------------------------------|
| NF-YA forward    | GCAGGACGATATCTCTAGCT           |
| NF-YA reverse    | AAATCGTCCACCTTCACCACG          |
| NF-YB forward    | ACGGGAAAGGTAACGTAGAGG          |
| NF-YB reverse    | TGCCTCCAATAAGTGGGAGAG          |
| SREBP1 forward   | GTGGCGGCTGCATTGCATTGAGAGTGAAG  |
| SREPB1 reverse   | AGGTACCCGAGGGCATCCGAGAAT       |
| c-MYC forward    | CCTCAACGTTAGCTTCACCAA          |
| C-MYC reverse    | TTTGATGAA GGTCTCGTCGTC         |
| H3 forward       | GTGAAGAAACCTCATCGTTACAGGCCTGGT |
| H3 reverse       | CTGCAAAGCACCAATAGCTGCACTCTGGAA |
| Pre-SCD1 forward | TTTCGAGTTGTGCTGCCTTC           |
| Pre-SCD1 reverse | TCACATCCCCACGAAGACAA           |

Tabella 1. Lista degli oligonucleotidi utilizzati per gli esperimenti di RT-PCR

**ChIP\_primers**

| <b>Oligonucleotidi</b>  | <b>Sequenza (5'-3')</b>  |
|-------------------------|--------------------------|
| (-921/-767) forward     | CAGAGCCATTGTTTCGCAGG     |
| (-921/-767) reverse     | CCACTAACATCTCCGTCCCCG    |
| (-767/-453) forward     | ACGGAGATGTTAGTGGTGGG     |
| (-767/-453) reverse     | TTTCTCTCTGGAAGGGGCTG     |
| (-451/-225) forward     | CCTTCCAGAGAGAAAGCTCCC    |
| (-451/-225) reverse     | TGTAAACTCCGGCTCGTCAT     |
| (-271/-117) forward     | ACGAGCCGGAGTTTACAGAA     |
| (-271/-117) reverse     | CCCTTTTATCCGCTGCCAAG     |
| (-135/-1) forward       | GACAACCAGCTAGCGTGC       |
| (-135/-1) reverse       | GGATGCCGGGATCACTTTC      |
| IR forward              | TTTGCTTTCGGTCTCTGTGC     |
| IR reverse              | ACAACGGGAAGCTGAGGAAA     |
| GAPDH promotore forward | TACTAGCGGTTTTACGGGCG     |
| GAPDH promotore reverse | TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA |

Tabella 2. Lista di primers utilizzati per l'analisi di ChIP-qPCR.

**Mutagenesi CRISPR/Cas9\_primers**

| <b>sgRNA</b>                | <b>Sequenza (5'-3')</b>     |
|-----------------------------|-----------------------------|
| SCD1(G1)p1ko_bbsl_Forward   | CACCG GTACCAGAGCCATTGTTTCGC |
| SCD1(G1)p1ko_bbsl_Reverse   | AAAC GCGAACAATGGCTCTGGTAC C |
| SCD1(G2)p1/2ko_bbsl_Forward | CACCG GGC ACTGGGGAAGTTTCTC  |
| SCD1(G2)p1/2ko_bbsl_Reverse | AAAC GAGAAACTTCCCCAGTGCCC C |
| SCD1(G3)p2/ko_bbsl_Forward  | CACCG CCTCTGGGGAAATGCTAATG  |
| SCD1(G3)p2ko_bbsl_Reverse   | AAAC CATTAGCATTTCCCCAGAGG C |
| <b>PCR</b>                  | <b>Sequenza (5'-3')</b>     |
| SCD1_promoter forward       | GTGCCAGAACATTTCTCTGG        |
| SCD1_promoter reverse       | CGAGAGCCTACGGCCCTAGTG       |

Tabella 3. Lista degli inserti sgRNA utilizzati per la mutagenesi del promotore di SCD1

mediante il sistema CRISPR/Cas9, e primers utilizzati per il sequenziamento.

### **3.16 Reagenti e plasmidi**

Il composto MF438 è stato gentilmente fornito da Ziga Jakopin. I reagenti utilizzati negli esperimenti di trasfezione, e silenziamento genico sono stati descritti in Noto et al. E in Pisanu et al. (A. Noto et al., 2017). Il plasmide pSpCas9 (BB)-2A-puro (PX459) V2.0 è stato ottenuto dall'Addgene, ed utilizzato per la mutagenesi CRISPR/Cas9 (Cong et al., 2013; Phoebe, n.d.).



## 4 RISULTATI PARTE I°

### 4.1 Espressione e localizzazione di YAP e TAZ in CSCs del polmone

È stato dimostrato che il *pathway* di Hippo ha un ruolo importante nelle cellule staminali tumorali del mammella e nell'epatocarcinoma, la sua implicazione risulta poco studiata nelle cellule staminali tumorali del polmone (Bartucci et al., 2015; Cordenonsi et al., 2011; Hayashi et al., 2015). Le osservazioni riguardo il ruolo del *pathway* di Hippo mediante la valutazione dell'espressione dei suoi effettori, YAP e TAZ, in linee stabili e primarie di adenocarcinoma del polmone derivanti da versamento pleurico maligno (MPEs). Le linee cellulari cresciute in condizioni di 2D, mostrano elevati livelli di YAP e TAZ (Figura 9 a). Al fine di comprendere il ruolo del *pathway* di Hippo nel nostro sistema biologico, sono state selezionate le linee che presentano sia elevati livelli di SCD1 che dei marcatori di staminalità (Nanog, OCT4 e ALDH1A1) in condizione di 3D; in particolare, le linee PE 4/15 e PE 5/15, e nella linea PE O/11 precedentemente caratterizzata (Noto et al., 2013).

L'attività di YAP e TAZ dipende dalla loro localizzazione nucleare, infatti, è stata valutata la loro espressione e localizzazione subcellulare mediante immunofluorescenza in linee primarie cresciute in condizioni di 3D. In tutte le colture primarie, derivanti da pazienti diversi, è stata osservata una prevalente localizzazione nucleare di YAP/TAZ, suggerendo che, le proteine YAP/TAZ sono attive trascrizionalmente (Figura 9 b). La deplezione di YAP/TAZ, mediante silenziamento genico, abbatte fortemente la capacità di formazione degli sferoidi nella linea PE O/11. In linea con questo risultato, si osserva una diminuzione dei livelli di mRNA dei marcatori di staminalità di OCT4, Nanog e ALDH1A1. Inoltre, il silencing di YAP/TAZ provoca una notevole riduzione della vitalità cellulare e della fosforilazione delle MAPK (Erk1/2) (Figura 9 c-f). Parallelamente si osserva un aumento della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), della fosforilazione dell'istone H2AX e dell'apoptosi, osservato mediante il saggio con l'Annessina V (Figura 9 g-h). I dati suggeriscono che YAP/TAZ sono necessari per il mantenimento delle CSCs nel polmone.

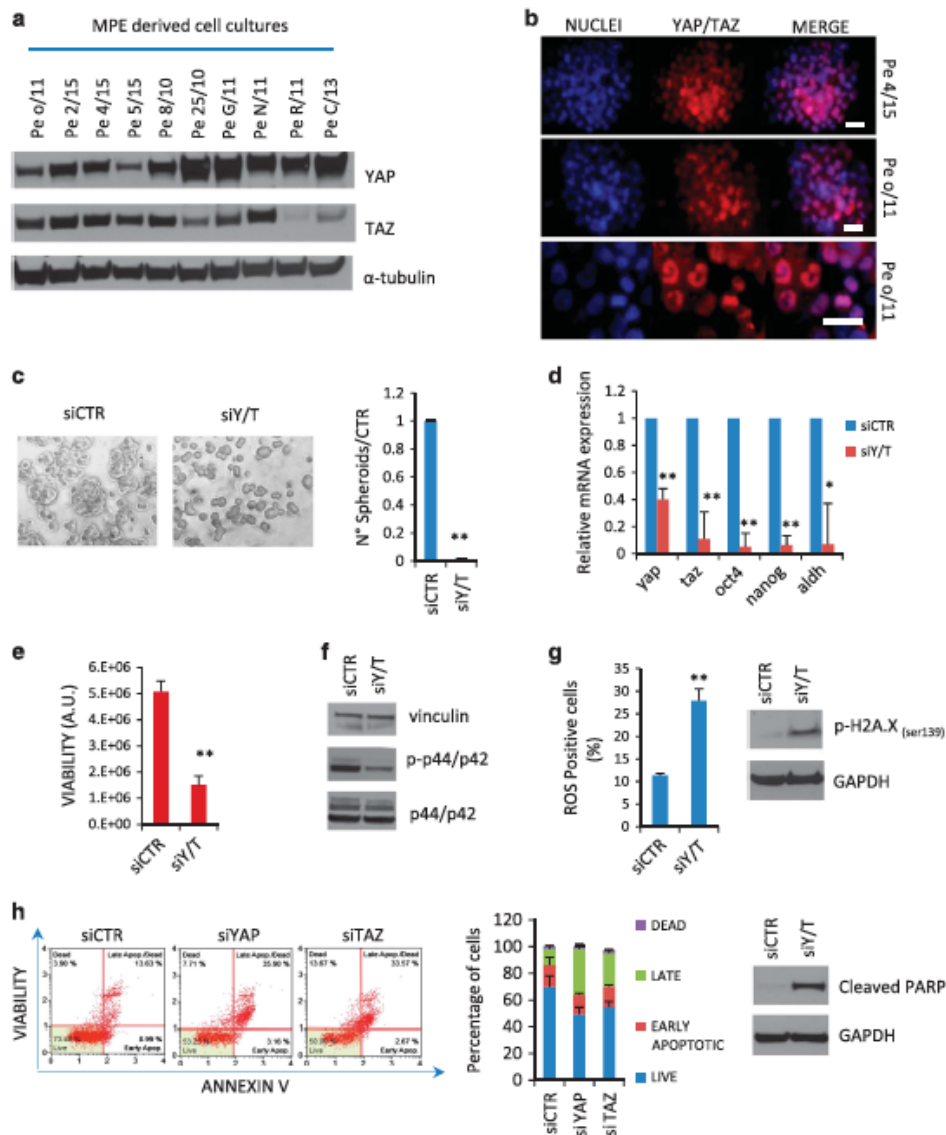
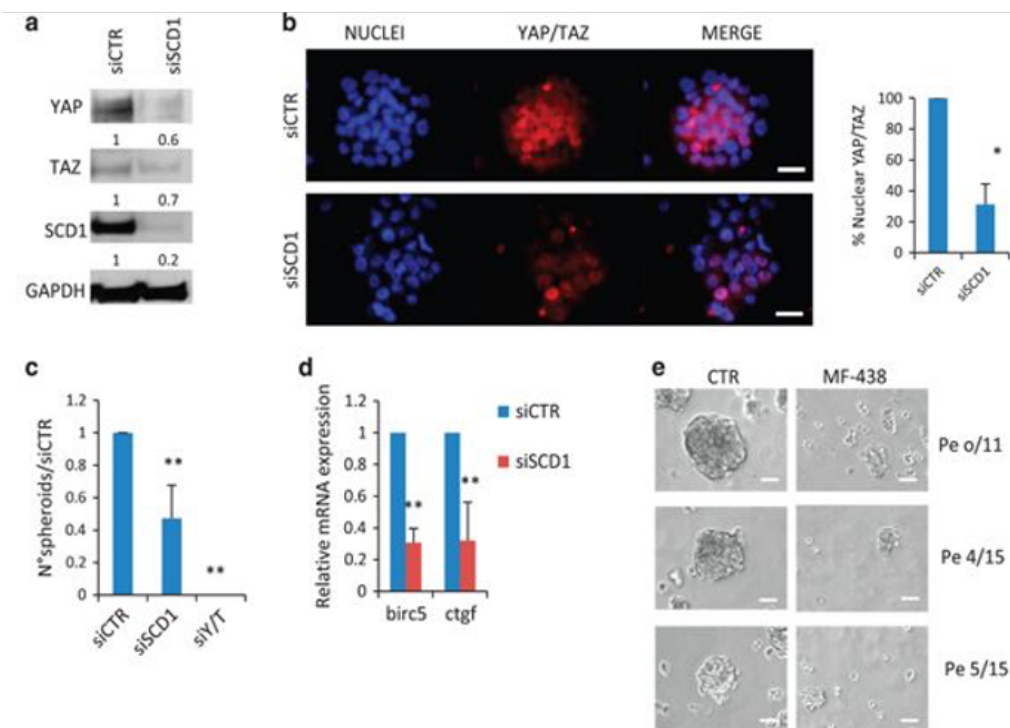


Figura 9. YAP/TAZ sono richiesti per la formazione delle cellule 3D nel tumore al polmone. (a) Western Blot rappresentativo dei livelli di espressione di YAP e TAZ in un pannello di linee cellulari (MPEs). La  $\alpha$ -tubulina è usata come normalizzatore. (b) L'IF di YAP e TAZ nelle 3D di due linee cellulari primarie PE o/11 e PE 4/15. Il pannello in basso mostra un ingrandimento del pannello centrale. La colorazione dei nuclei è stata ottenuta tramite l'utilizzo del colorante Hoechst 33342. Nel MERGE sono mostrate le immagini sovrapposte per identificare la localizzazione nucleare di YAP/TAZ. Barra di scala 50  $\mu$ m. (c) Immagine rappresentativa di sferoidi della linea PE o/11 silenziati o meno per YAP e TAZ. Il saggio di formazione degli sferoidi mostra come il silenziamento di YAP e TAZ riduce la capacità di formazione degli sferoidi nella linea PE o/11. (d) Analisi RT-PCR dei livelli di mRNA di YAP e TAZ, e dei marcatori di staminalità Oct4, Nanog e ALDH in sfere silenziati per YAP/TAZ (siY/T) rispetto alle sfere siRNA di controllo (siCTR). L'espressione relativa è calcolata rispetto all'actina, usato come normalizzatore. I dati mostrati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . (e) Saggio di vitalità cellulare in cellule 3D della linea stabile NCI-H460 silenziati o meno per YAP e TAZ. Il saggio è stato eseguito dopo 120 ore dal silenziamento. (f) Western Blot rappresentante i livelli proteici della forma clivata di PARP (Poly ADP ribose-polymerase) in 3D della linea NCI-H460 silenziati o meno per YAP e TAZ. La GAPDH è stata usata come normalizzatore di caricamento. (g) Pannello di sinistra: grafico che riportano in ascissa la positività crescente della fluorescenza emessa da Annessina V-PE e in ordinata quella crescente della 7-AAD, valutata tramite citofluorimetria, in 3D della linea NCI-H460 silenziati per YAP, TAZ o con siRNA di controllo. Pannello: grafico che riporta la percentuale di cellule vive (live), morte (dead), in apoptosi precoce (early apoptotic) ed in apoptosi tardiva (late) in campioni di sferoidi della linea NCI-H460 silenziati per YAP, TAZ o con siRNA di controllo. (h) Pannello di sinistra: grafico che riporta la percentuale di cellule positive alla presenza di specie reattive all'ossigeno (ROS), ottenuto tramite saggio di citometria a flusso, in 3D silenziati per YAP e TAZ (siY/T) o con

siRNA di controllo (siCTR). Pannello di destra: Western Blot raffigurante i livelli di espressione della variante istonica H2AX, fosforilata sulla serina 139, in s3D silenziati per YAP e TAZ e in 3D di controllo. La GAPDH è stata usata come normalizzatore di caricamento. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. \*\*p < 0.01, \*p < 0.05.

## 4.2 SCD1 regola l'espressione e l'attività di YAP/TAZ nelle cellule 3D di polmone

Al fine di chiarire il ruolo del *pathway* di Hippo, sono stati misurati i livelli di YAP/TAZ in cellule 3D in cui viene depletata l'attività di SCD1. È stato osservato che, inibendo l'attività di SCD1 tramite silenziamento genico o trattamento farmacologico con MF438, si determina la diminuzione dei livelli proteici di YAP/TAZ (Figura 10 e-f). In linea con i precedenti dati, è stata dimostrata la riduzione dell'espressione totale e nucleare di YAP/TAZ mediante immunofluorescenza, effetto associato alla perdita della capacità di formazione degli sferoidi, come precedentemente dimostrato (Noto et al., 2013). Inoltre, la diminuzione dell'attività trascrizionale di YAP/TAZ è avvalorata dalla riduzione dei livelli di mRNA dei geni target *birc5* e *CTGF* (Figura 10 a-d; g). Infine, i risultati ottenuti con il microscopio confocale, rafforzano la diminuzione della positività dell'espressione cellulare di YAP/TAZ, in cellule trattate con MF438 (Figura 10 h).



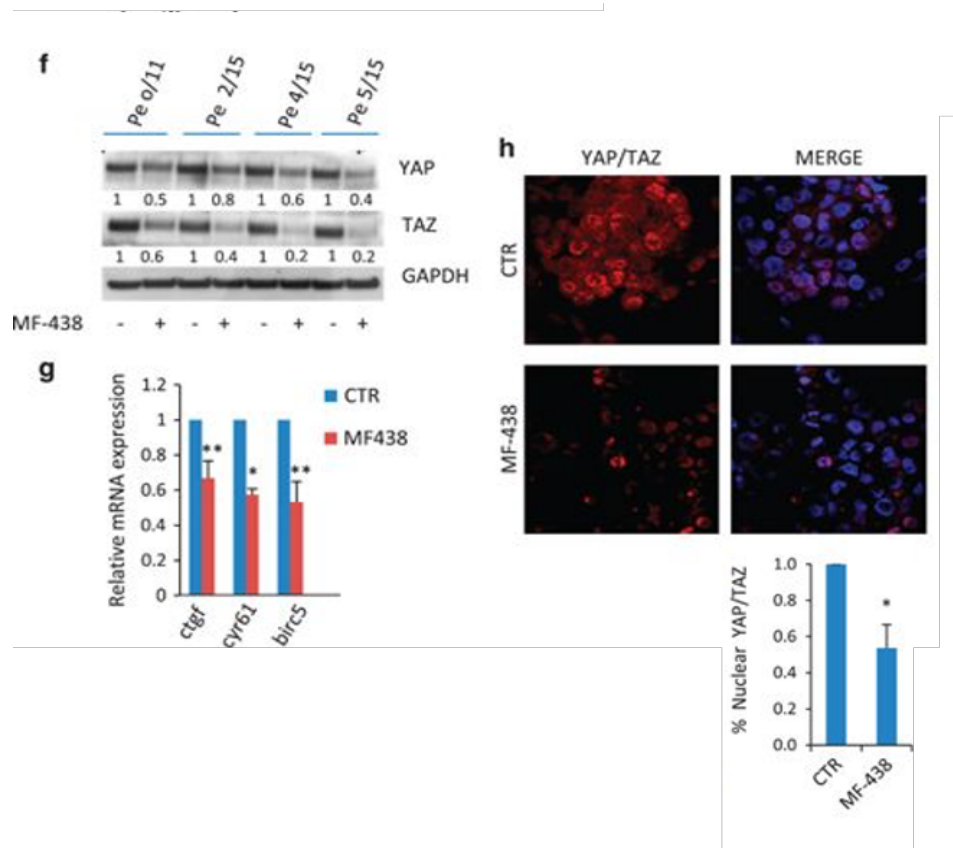


Figura 10. il silenziamento genico e l'inibizione farmacologica di SCD1 riduce l'espressione e l'attività di YAP e TAZ. (a) Western Blot rappresentativo dei livelli di espressione di YAP e TAZ in cellule 3D della linea PE o/11 silenziati o meno per SCD1 GAPDH è usato come normalizzatore. (b) Pannello di sinistra: IF rappresentativa di YAP e TAZ in sferoidi della linea PE o/11 silenziati per SCD1 (siSCD1) o trattati con siRNA di controllo (siCTR). La colorazione dei nuclei è stata ottenuta tramite l'utilizzo del colorante Hoechst 33342. Barra di scala 50µm. Pannello di destra: quantizzazione dei livelli nucleari di YAP e TAZ in 3D della linea PE o/11 trattati con siSCD1 o con siCTR. I dati mostrati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti dove sono state contate almeno 300 cellule. \* $p < 0.05$ . (c) Saggio di formazione degli sferoidi effettuato sulla linea PE o/11 siSCD1, siYAP/TAZ o siCTR. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di almeno tre esperimenti indipendenti. \*\* $p < 0.01$ . (d) Analisi RT-PCR dei livelli di mRNA di birc5 e ctgf, geni target di YAP e TAZ, in sferoidi della linea PE o/11 silenziati o meno per SCD1. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. \*\* $p < 0.01$ . (e) Immagini rappresentative di cellule 3D delle linee primarie PE o/11, PE 4/15 e PE 5/15 trattate o meno per 72 ore con 5 µM dell'inibitore MF-438. Barra di scala 5µm. (f) Western Blot dei livelli di espressione di YAP e TAZ in 3D della linee primarie PE o/11, PE 2/15, PE 4/15 e PE 5/15 trattati o meno per 72 ore con 5 µM dell'inibitore MF-438. L'analisi densitometrica è effettuata usando come normalizzatore la GAPDH. (g) RT-PCR dei livelli di mRNA di birc5, ctgf e cyr61, tre geni target di YAP e TAZ, in sferoidi della linea PE o/11 trattati per 72 ore con MF-438. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . (h) Pannello di sinistra: immagini al microscopio confocale rappresentative dell'IF condotta su cellule 3D della linea PE o/11 trattati o meno per 72 ore con MF-438, per valutare la localizzazione subcellulare di YAP/TAZ. La colorazione dei nuclei è stata ottenuta tramite l'utilizzo del colorante Hoechst 33342. Nel MERGE sono mostrate le immagini sovrapposte per identificare la localizzazione nucleare di YAP/TAZ. Pannello di destra: grafico che riporta la percentuale di nuclei positivi alla colorazione per YAP/TAZ valutata dopo 72 ore di trattamento con MF-438 in 3D della linea PE o/11, i dati sono normalizzati sul campione non trattato (CTR). I risultati mostrati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti, dove sono state contate almeno 300 cellule. \* $p < 0.05$ .

### 4.3 L'inibizione SCD1 cambia l'ultrastruttura cellulare e il profilo degli acidi grassi nelle cellule 3D di adenocarcinoma del polmone

Al fine di valutare la composizione degli acidi grassi delle tre linee primarie, è stato utilizzato il profilo metilesteri con il FAME. Il profilo degli acidi grassi mostra un incremento della percentuale di acidi grassi insaturi nel passaggio da condizioni di coltura in 2D a 3D. Nel momento in cui le cellule 3D sono trattate con MF438, si assiste a un marcato incremento della percentuale di acidi grassi saturi, dimostrando come l'inibizione dell'attività di SCD1 blocca la conversione degli acidi grassi da saturi a monoinsaturi (Figura 11). Mediante la microscopia elettronica è stato possibile osservare l'effetto dell'inibizione di SCD1 in cellule 3D. Le immagini presentano una maggiore complessità del citoplasma e la presenza di vacuoli nel citosol in cellule trattate con MF438 rispetto al controllo. Inoltre, l'analisi ultrastrutturale delle cellule 3D non trattate mostrano un accumulo di gocce lipidiche senza membrana (lipid droplets, LDs) nel citoplasma, che diminuiscono nettamente nelle cellule 3D trattate con MF438. Il trattamento con l'inibitore di SCD1 induce, molto spesso, una polarizzazione della F-actina nella porzione della membrana plasmatica, a dimostrazione del fatto che avviene un rimodellamento del citoscheletro (Figura 11).

**Table 1.** Relative percentage composition of the main saturated (palmitic, stearic) and unsaturated (palmitoleic, oleic, linoleic) fatty acids in test cells (Pe o/11, Pe 4/15, Pe 5/15)<sup>a</sup>

| Fatty acid          | Pe o/11    |            |            | Pe 4/15    |            |            | Pe 5/15    |            |            |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                     | 2D         | 3D CONTROL | 3D MF-438  | 2D         | 3D CONTROL | 3D MF-438  | 2D         | 3D CONTROL | 3D MF-438  |
| Palmitic (C16:0)    | 38.8 ± 4.5 | 40.1 ± 5.7 | 37.9 ± 4.1 | 29.9 ± 4.1 | 36.9 ± 4.1 | 39.4 ± 3.6 | 29.1 ± 3.5 | 28.4 ± 3.0 | 31.2 ± 2.7 |
| Stearic (C18:0)     | 14.0 ± 1.4 | 7.0 ± 0.9  | 39.5 ± 1.1 | 14.8 ± 1.4 | 9.4 ± 1.0  | 31.8 ± 2.0 | 22.3 ± 1.3 | 12.3 ± 4.5 | 33.4 ± 2.3 |
| (Total saturated)   | 52.8       | 47.1       | 77.4       | 44.7       | 46.3       | 71.2       | 51.4       | 40.7       | 64.6       |
| Palmitoleic (C16:1) | 4.1 ± 0.1  | 8.0 ± 0.5  | 1.1 ± 0.1  | 5.0 ± 0.2  | 4.0 ± 0.3  | 1.4 ± 0.3  | 2.0 ± 0.3  | 5.0 ± 0.7  | 0.8 ± 0.1  |
| Oleic (C18:1)       | 42.9 ± 5.2 | 44.3 ± 3.9 | 20.2 ± 2.3 | 49.8 ± 5.5 | 48.0 ± 4.5 | 23.6 ± 2.9 | 46.6 ± 2.8 | 49.6 ± 3.5 | 30.0 ± 2.3 |
| Linoleic (C18:2)    | 0.2 ± 0.0  | 0.6 ± 0.1  | 1.3 ± 0.2  | 0.5 ± 0.1  | 1.7 ± 0.3  | 3.8 ± 0.1  | —          | 4.7 ± 0.5  | 4.6 ± 0.4  |
| (Total unsaturated) | 47.2       | 52.9       | 22.6       | 55.3       | 53.7       | 28.8       | 48.6       | 59.3       | 35.4       |

Analysis was carried out in 2D adherent cells, 3D cultures and 3D cultures treated for 72 h with 5 μM MF-438. Data are the mean ± s.e., at least three analyses for each sample. Abbreviations: 2D, two-dimensional; 3D, three-dimensional. \*Mean ± s.e., at least three analyses for each sample.

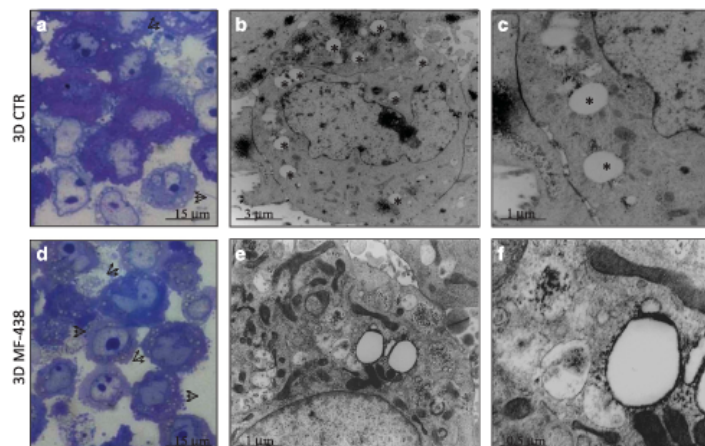


Figura 11. L'inibizione di SCD1 induce modificazioni delle 3D. In alto, la tabella riporta l'analisi relativa la percentuale di composizione dei principali acidi grassi presenti nelle cellule primarie (MPEs) di adenocarcinoma del polmone. Le cellule sono state analizzate tramite FAME in tre condizioni: cellule in 2D, cellule in 3D, cellule 3D trattate con l'inibitore di SCD1 (MF438). In basso, le immagini rappresentative l'ultrastruttura cellulare dell'effetto dovuto all'inibizione di SCD1 in cellule 3D. (a, d) Colorazione con blue-Toulidina delle cellule 3D della linea PE o/11 trattate e non con MF438. (b, e) L'analisi ultrastrutturale rivela la presenza di vacuolizzazione nel citoplasma delle cellule controllo dipendenti dall'accumulo delle membrane libere da LDs (\*). Al contrario, i citoplasmici delle cellule 3D trattate presentano un incremento delle vescicole nelle membrane citoplasmatiche, e le LDs sembrano essere assenti. (c) e (f) rappresentano gli ingrandimenti delle sezioni (b) ed (e) rispettivamente.

#### 4.4 SCD1 regola l'attività di YAP/TAZ in CSCs di polmone mediante la modulazione del pathway della $\beta$ -catenina

In letteratura viene riportato che SCD1 è coinvolto nell'attivazione del *pathway* di Wnt/ $\beta$ -catenina nel carcinoma della mammella (Mauvoisin et al., 2013). L'attività enzimatica di SCD1 è necessaria per la produzione di proteine attive e modificate a livello lipidico, che rappresentano la forma attiva dei ligandi specifici dei recettori FDZ responsabili dell'attivazione del *pathway* di Wnt/ $\beta$ -catenina (Rios-Esteves et al., 2014; Rios-Esteves & Resh, 2013). Considerando che, l'attività di YAP/TAZ è associata con l'attivazione della regolazione di  $\beta$ -catenina, sono stati condotti esperimenti volti ad indagare se la modulazione di YAP/TAZ attraverso SCD1 avviene attraverso la  $\beta$ -catenina (Azzolin et al., 2014). È stato osservato, mediante l'analisi di microscopia confocale, che nelle cellule cresciute in condizioni di 3D la  $\beta$ -catenina è distribuita sia nel compartimento citoplasmatico che nella regione nucleare. Mentre si assiste a una ridistribuzione della  $\beta$ -catenina in cellule trattate con MF438, in cui la proteina è localizzata nel citoplasma. In linea con i dati, l'inibizione di SCD1 mediante silenziamento genico o trattamento farmacologico determina la riduzione dei livelli di mRNA dell'*axin2*, gene target della  $\beta$ -catenina (Figura 12 a-b).

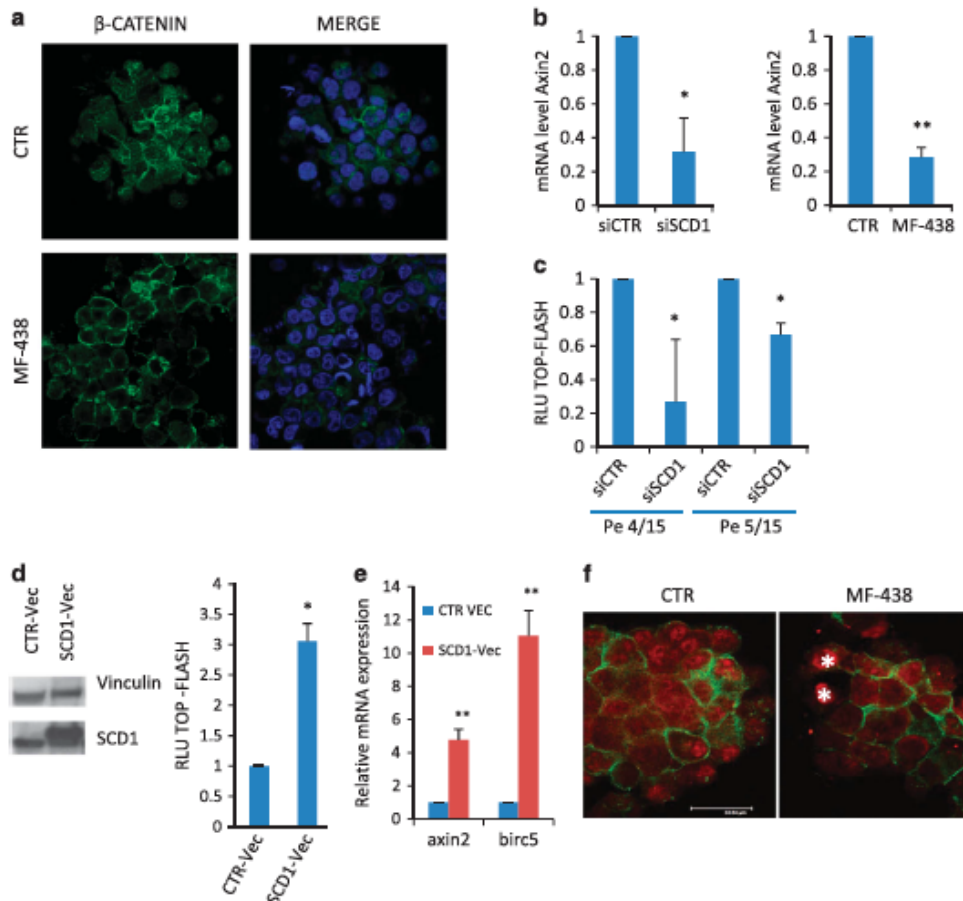


Figura 12. SCD1 regola l'attività di YAP/TAZ in CSCs di polmone mediante la modulazione del segnale della  $\beta$ -catenina. (a) Immagini del microscopio a confocale dell'IF della localizzazione di  $\beta$ -catenina nelle cellule 3D della linea PE o/11 trattate e non con MF438 per 72 ore. La colorazione dei nuclei è stata ottenuta tramite l'utilizzo del colorante Hoechst 33342. (b) RTPCR dei livelli di Axin2 nella linea PE o/11 silenziata per SCD1 (pannello di sinistra), o trattate con MF438 (pannello di destra). I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . (c) Saggio di luciferasi (TOP-FLASH) in cellule 3D delle linee PE 4/15 e PE 5/15 silenziata o meno per SCD1. Tutti i risultati sono normalizzati verso il controllo. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. \* $p < 0.05$ . (d) Le cellule HEK293T sono co-trasfettate con il plasmide pCDNA3.1 che esprime SCD1 e con il vettore di controllo reporter TOP-FLASH per 24h. Il pannello di sinistra mostra il WB. I risultati mostrati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti, \* $p < 0.05$ . (e) RTPCR mostra i livelli di espressione dell'axin2, target gene di  $\beta$ -catenina, e di birc5, target gene di YAP/TAZ. I dati sono normalizzati con Actina. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. \*\* $p < 0.01$ . (f) Immagine rappresentativa della co-localizzazione di  $\beta$ -catenina (verde) e YAP/TAZ (rosso) nel controllo e nelle cellule trattate con MF438 delle 3D della linea PE o/11. Barra di scala 33.64  $\mu$ m.

Il silenziamento di SCD1 induce una riduzione dei livelli trascrizionali della  $\beta$ -catenina, valutata mediante il sistema reporter TOP-FLASH nelle linee primarie. Il dato viene confermato nella linea stabile di adenocarcinoma del polmone NCI-H460, che successivamente al silenziamento genico si evidenzia la riduzione dei livelli trascrizionali sia dei livelli di YAP/TAZ che della  $\beta$ -catenina (Figura 12 c).

Al fine di dimostrare che SCD1 è coinvolto nell'attivazione della  $\beta$ -catenina è stata indotta la sua espressione in cellule che esprimono bassi livelli della

proteina. È stato utilizzato il TOP-FLASH per indurre l'espressione di SCD1 nelle HEK293T, e parallelamente è stato possibile osservare l'incremento dell'attività di  $\beta$ -catenina e del suo gene target (*axin2*) (Figura 12 d-e). Sorprendentemente, inibendo l'attività di  $\beta$ -catenina mediante l'utilizzo d'inibitori, C59 o XAV-929, si osserva la diminuzione di espressione di YAP/TAZ, corrisponde a una marcata inibizione di formazione degli sferoidi simile a quella dimostrata inibendo SCD1. Per studiare la relazione tra l'attivazione  $\beta$ -catenina e la distribuzione nucleare di YAP/TAZ, è stata eseguita la doppia immunofluorescenza attraverso il microscopio confocale. Le cellule 3D (controllo) hanno i nuclei positivi per YAP/TAZ e in qualche caso sono positivi anche per la  $\beta$ -catenina. Dopo il trattamento delle cellule 3D con MF438, solo in poche cellule, YAP/TAZ mantengono una forte positività mentre la  $\beta$ -catenina non viene espressa sia a livello nucleare che citoplasmatica (Figura 12 f).

Quindi, se nelle CSCs di polmone, SCD1 attiva YAP/TAZ mediante l'acetilazione del ligando Wnt attraverso la via di attivazione di  $\beta$ -catenina, è possibile ottenere il rescue della funzione di YAP/TAZ, in cellule in cui viene inibito SCD1, mediante l'aggiunta del ligando Wnt esogeno. La Figura 13 a mostra come sia possibile avere una reversione dei livelli di YAP/TAZ mediante l'aggiunta del ligando Wnt3a in cellule 3D non trattate, indicando che Wnt3a è necessario e sufficiente a stabilizzare YAP/TAZ. Per confermare quanto detto, sono stati effettuati esperimenti volti a dimostrare che, mentre il terreno condizionato di cellule 3D non trattate induce l'attivazione del gene target (*axin2*) della  $\beta$ -catenina; il terreno condizionato delle cellule 3D silenziate per SCD1 non ottiene lo stesso effetto (Figura 13 b-c). Nel momento in cui SCD1 viene inibito, la capacità di formare sferoidi viene revertita aggiungendo Wnt3a in maniera esogena. Al contrario, quando YAP/TAZ sono silenziati, l'aggiunta del ligando Wnt3a non è in grado di indurre il rescue in termini di vitalità cellulare e capacità di formazione delle cellule 3D, dimostrando che la l'attivazione del *pathway* della  $\beta$ -catenina avviene a monte di YAP/TAZ.



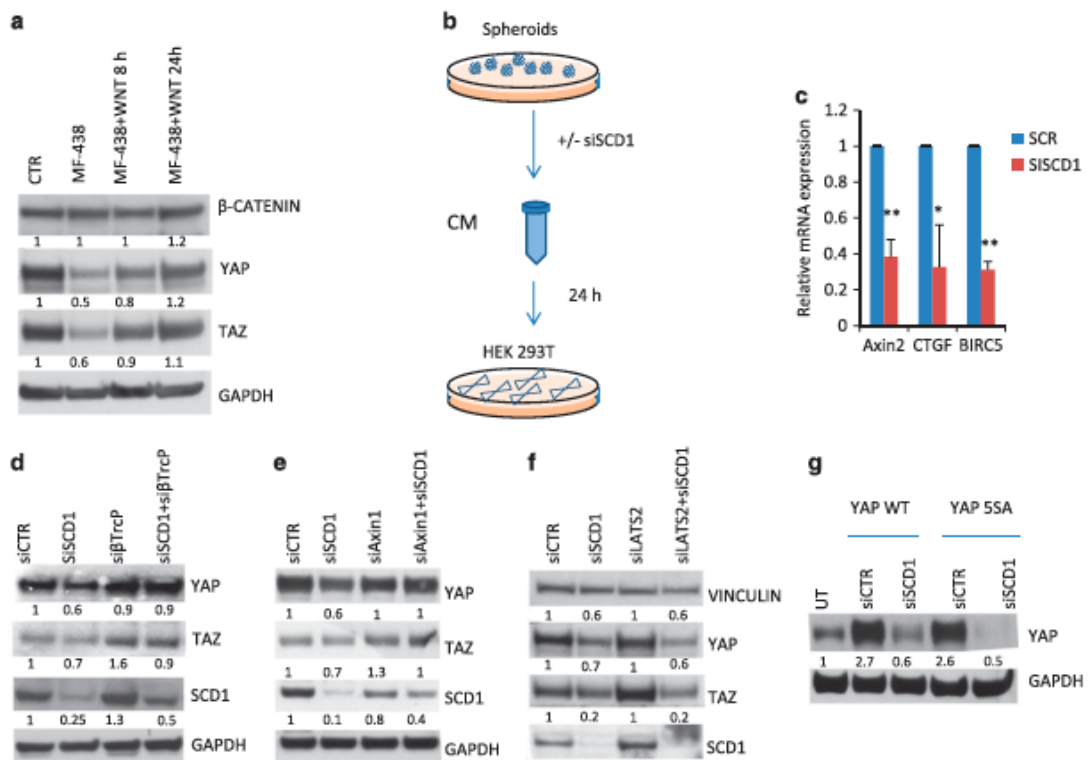


Figura 13. Wnt3a stabilizza YAP/TAZ in 3D inibite per SCD1 e richiede l'inattivazione del complesso di degradazione. (a) WB di YAP/TAZ,  $\beta$ -catenina delle cellule 3D della linea PE o/11 stimolate e non con 100 ng/ml del ligando wnt3a in presenza o meno di 10  $\mu$ m di MF438. Il trattamento con MF438 è di 48 ore. La GAPDH è utilizzata come normalizzatore. (b) Rappresentazione schematica del protocollo sperimentale usato per preparare il terreno condizionato. 24 ore dopo il silenziamento il supernatante delle cellule 3D è centrifugato e usato per stimolare le HEK293T. Dopo 24 ore le HEK293T sono raccolte per essere analizzate. (c) RTPCR di Axin2, ctgf, birc5 nelle cellule HEK293T trattate con il terreno condizionato delle 3D silenziate per SCD1 e scr. I risultati dati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre replicati biologici indipendenti. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . (d) le cellule 3D della linea PE o/11 è stata silenziate per SCD1,  $\beta$ -TrcP o entrambe. Il WB mostra l'espressione proteica per valutare i livelli di YAP/TAZ e SCD1. GAPDH è utilizzato come normalizzatore. (e) le cellule 3D della linea PE o/11 è stata silenziate per SCD1, axin1 e co-silenziante. Il WB mostra l'espressione proteica per valutare i livelli di YAP/TAZ e SCD1. GAPDH è utilizzato come normalizzatore. (f) Le cellule 3D della linea PE o/11 è stata silenziate per SCD1, LATS2 e co-silenziante. Il WB mostra l'espressione proteica per valutare i livelli di YAP/TAZ e SCD1. Vinculina è utilizzato come normalizzatore. (g) la linea stabile NCI-H460 è silenziate per SCD1 e dopo 24 ore trasfettata con il plasmide che esprime YAP wt o il mutante YAP55A. L'espressione proteica di YAP totale è mostrata nel WB. GAPDH è utilizzato come normalizzatore.

Al fine di confermare i dati precedenti, è stato analizzato il ruolo di  $\beta$ -catenina nel complesso di degradazione, formato dall'ubiquitina ligasi  $\beta$ -TrcP, Axin1, GSK e la proteina APC. Il complesso è coinvolto nella stabilizzazione o degradazione di  $\beta$ -catenina e di YAP/TAZ, come dimostrato (Azzolin et al., 2014). Sono stati misurati i livelli di YAP/TAZ dopo aver silenziato le cellule 3D per SCD1 sia singolarmente che in combinazione con  $\beta$ -TrcP nella linea primaria PE 0/11. La degradazione di YAP e TAZ, indotta dall'inibizione di SCD1, è revertita dal co-silenziamento di  $\beta$ -TrcP, indicando che l'ubiquitina ligasi è coinvolta nella degradazione di YAP/TAZ mediante SCD1 (Figura 13 d). Per stabilire chi

partecipa al complesso di degradazione, sono stati condotti esperimenti di co-silenziamento di SCD1 e Axin1, ottenendo anche in questo caso la reversione della degradazione di YAP/TAZ (Figura 13 e). Per quanto riguarda le chinasi LATS1/2, sappiamo esser coinvolte nella fosforilazione di YAP/TAZ che provoca l'inibizione e degradazione, per questo è stato investigato se le chinasi LATS sono responsabili della degradazione di YAP/TAZ mediata da SCD1. Silenziando contemporaneamente SCD1 e le chinasi, è stato dimostrato che le LATS non partecipano alla regolazione di YAP/TAZ quando SCD1 viene inibito (Figura 13 f). Per avvalorare il dato è stato dimostrato che il silenziamento di SCD1, nella linea stabile NCI-H460 è in grado di indurre la degradazione sia di YAP *wild-type* che del mutante YAP5SA costitutivamente attivato quando overespresso. I dati sono rafforzati dal fatto che, la regolazione di YAP/TAZ mediata da SCD1 non dipende dalla fosforilazione di YAP/TAZ (Figura 13 g).

#### **4.5 L'espressione di SCD1, YAP/TAZ, $\beta$ -Catenina correlano negativamente con la sopravvivenza di pazienti affetti da l'adenocarcinoma del polmone**

Per chiarire meglio l'interazione tra i geni, è stata eseguita l'immunoistochimica per valutare l'espressione di SCD1 su sezioni di pazienti con adenocarcinoma del polmone (n=10). L'espressione immuno-fenotipica di SCD1 non è uniforme nei diversi casi e all'interno dello stesso campione. In base all'espressione citoplasmatica di SCD1 sono state distinte tre diverse aree: alta espressione (>50% di cellule positive per SCD1), bassa espressione (>5% >50%) e negative (<5%) (Figura 14 a). I casi risultano essere particolarmente interessanti, poiché presentano delle aree in cui l'espressione di YAP/TAZ e  $\beta$ -catenina corrispondono con la marcatura di SCD1. I dati in vivo sono in linea con i dati in vitro, dimostrando che SCD1 attiva la cascata del segnale in grado di stabilizzare l'espressione di  $\beta$ -catenina e YAP/TAZ. Per meglio definire l'associazione tra l'espressione di SCD1, YAP e TAZ e la sopravvivenza dei pazienti, è stato fondamentale avvalorarsi dell'analisi di bioinformatica di data set di espressione genica associati alla stadiazione dell'adenocarcinoma del polmone. Le curve di Kaplan-Meier mostrano la comparazione tra pazienti con elevati di livelli di co-espressione di mRNA sia di SCD1 e YAP, sia di SCD1 e  $\beta$ -Catenina, con la riduzione della sopravvivenza (Figura 14 b).

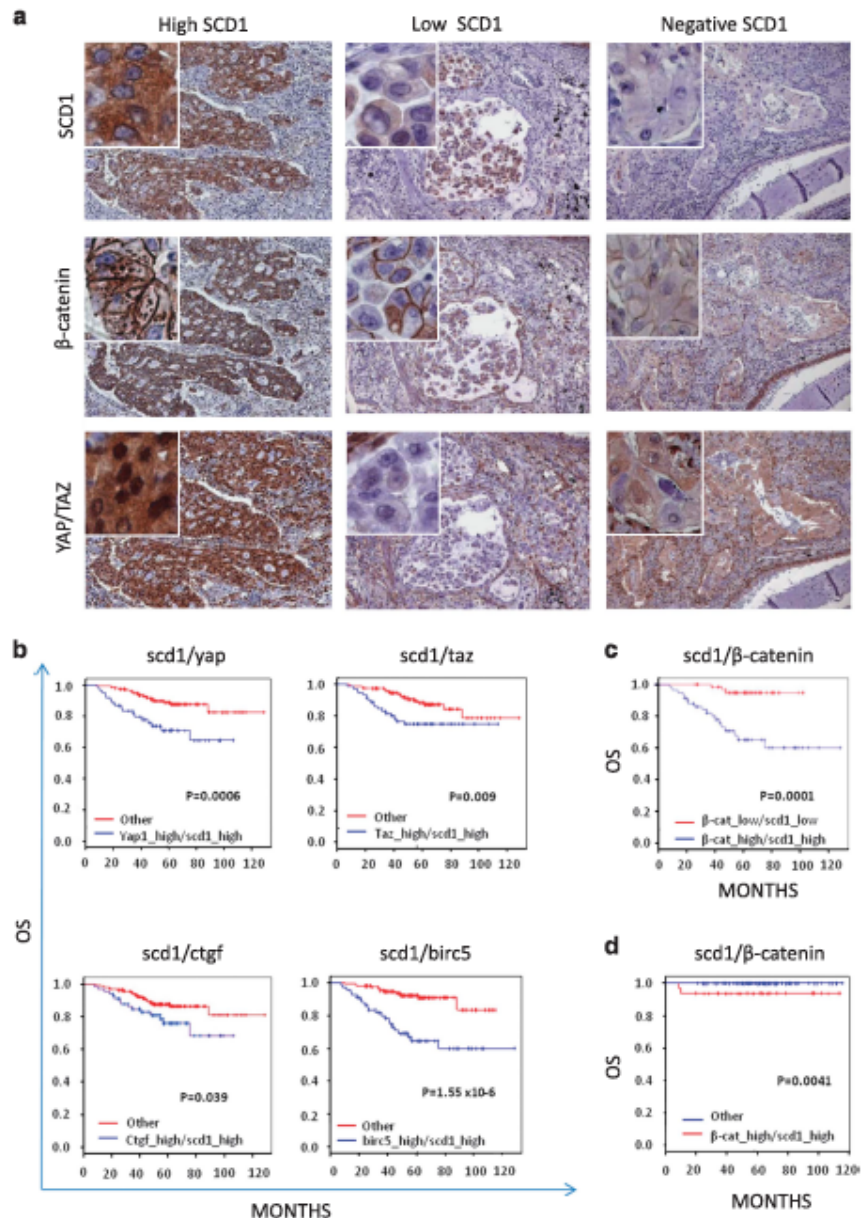


Figura 14. Co-espressione di SCD1 e YAP/TAZ in pazienti con adenocarcinoma. (a) Immunoistochimica di SCD1, YAP/TAZ e β-catenina. Nel pannello di sinistra, il campione mostra una forte espressione di SCD1. Nel pannello centrale e di destra è presente l'espressione intermedia e negativa di SCD1. Ingrandimento 100x, e 400x. Nel tessuto tumorale SCD1 è espresso nel citoplasma e raramente la marcatura è presente nel nucleo. β-catenina è positiva in qualche nucleo, e occasionalmente è presente sulla membrana e nei granuli citoplasmatici. (b) Pannello superiore: curve di Kaplan Meier che mostrano la sopravvivenza di pazienti con elevati livelli degli mRNA sia di SCD1 che di YAP (yap1\_high/scd1\_high) o elevati livelli degli mRNA sia di SCD1 che di TAZ (Taz\_high/scd1\_high) rispetto ai pazienti in cui l'espressione dei due geni non è correlata (Other). Pannello inferiore: un'analisi simile alla precedente è stata condotta per valutare la sopravvivenza dei pazienti che esprimono elevati livelli degli mRNA di SCD1 e ctgf (Ctgf\_high/scd1\_high) o di SCD1 e birc5 (birc5\_high/scd1\_high).

Risultati simili sono stati osservati sia in pazienti in cui SCD1 e TAZ sono entrambi overespressi, sia in casi in cui SCD1 co-esprime con birc5, ctgf (Figura 14 c). Al fine di verificare che l'effetto sinergico dei geni con la prognosi sfavorevole nel tumore al polmone sono indipendenti dal genere o dai parametri,

come la stadiazione tumorale e le alterazioni genetiche per l'esposizione al fumo, le analisi bioinformatiche sono state ripetute e suddivise come dati di espressione genica in 10 sottogruppi. Elevata co-espressione di SCD1 e YAP/TAZ, così come quella di SCD1 e birc5/ $\beta$ -catenina sono associati alla riduzione in tutti i sottogruppi tranne che per la stadiazione tumorale II (Figura 6 d). L'analisi bioinformatica ha identificare la combinazione con effetto sinergico nella sopravvivenza nel tumore al polmone in cui i geni di interesse sono statisticamente arricchiti. Una sopravvivenza infausta è associata con elevata espressione di SCD1, birc5 e  $\beta$ -catenina con il p-value 0,017 e un rapporto di probabilità di 2,85 che suggerisce la forte associazione tra l'elevata co-espressione dei 3 geni.

## 5 Conclusione

### 5.1 Parte I°

Il concetto emergente che il cancro è composto da una piccola popolazione di cellule dette cellule staminali tumorali (CSCs) è ampiamente discusso e approvato. Le CSCs rappresentano una sottopopolazione con capacità di autorinnovamento e resistente ai chemioterapici, oltre a rappresentare un target plausibile per future applicazioni cliniche. Uno degli obiettivi nella ricerca contro il cancro è la comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della generazione e della sopravvivenza di CSCs nei tumori solidi (Bartucci et al., 2015; Meacham & Morrison, 2013; Stefano Piccolo, Cordenonsi, & Dupont, 2013).

Per diversi aspetti questo rimane un obiettivo difficile da raggiungere, la difficoltà risiede principalmente nell'isolamento, attraverso l'uso di marcatori di superficie, di popolazioni potenzialmente di CSCs "pure". L'isolamento di cellule neoplastiche, derivanti da versamento pleurico di pazienti affetti da adenocarcinoma del polmone, associato alla capacità di propagazione *in vitro*, ha consentito di allestire una bio-banca di cellule primarie polmonari, caratterizzata da un considerevole numero di linee cellulari. Le linee primarie isolate negli ultimi anni costituiscono un buon modello per studiare sia la variabilità sia l'eterogeneità del tumore polmonare rappresentando, inoltre, una fonte di CSCs.

Nel presente studio è stato indagato il ruolo di SCD1 in CSCs di polmone, mostrando come questo enzima regola la sopravvivenza e la propagazione di CSCs attraverso la modulazione dell'attività di YAP e TAZ, i principali effettori di Hippo *pathway*. Recentemente è stato mostrato come il *pathway* di Hippo ricopra un ruolo importante nel cancro del polmone (Yeung et al., 2016). Nel NSCLC elevati livelli di TAZ sono stati associati a scarso differenziamento, metastatizzazione pleurica ed intravascolare e cattiva prognosi (Y. Wang et al., 2010; Xie et al., 2012). Risultati simili sono stati ottenuti a YAP, la cui espressione è significativamente correlata alla stadiazione TNM nel NSCLC ed è associata a scarsa sopravvivenza (Y. Wang et al., 2010).

L'attuale scenario della regolazione di YAP/TAZ è piuttosto complesso e inserisce i due fattori nell'articolato *pathway*. La complessità degli elementi utili a

mostrare che YAP/TAZ sono in parte regolati dalla via metabolica di *Wnt*/β-catenina dipende a sua volta dalla quantità di acidi grassi insaturi generati dall'attività di biosintesi di SCD1.

Nelle CSCs di polmone SCD1 è upregolato e la sua attività dipende dall'abbondante biosintesi di acidi grassi insaturi (Mancini et al., 2018). Gli acidi grassi insaturi, che rappresentano il substrato dell'enzima Porcupina presente sulle membrane cellulari, sono responsabili dell'acetilazione e del rilascio del ligando *Wnt*. Il ligando si lega al recettore FZD4, il complesso porta a inattivazione del complesso di degradazione e la conseguente localizzazione e stabilizzazione nucleare sia di β-catenina che di YAP/TAZ (Figura 15 a). Al contrario, quando SCD1 viene inibito, la biosintesi degli acidi grassi insaturi è fortemente alterata (Figura 15 b). Di conseguenza, il ligando *Wnt* non viene acetilato e rimane in forma inattiva libero nel citoplasma, in linea con i dati precedentemente osservati in cui le CSCs di polmone sono caratterizzate dall'up-regolazione del recettore FZD4 (Mancini et al., 2011). I risultati assumono particolare importanza alla luce delle recenti ricerche che dimostrano come alti livelli di LDs sono caratteristici delle CSCs nel cancro al colon; infatti gli elevati livelli sono correlati con altri marker di staminalità come CD133 e l'attivazione del *pathway* di *Wnt* (Tirinato et al., 2015).

I dati di bioinformatica avvalorano quanto detto, identificano la co-espressione di SCD1 e β-catenina o YAP/TAZ e dei loro geni target *birc5* e *ctgf*, come fattori prognostici nell'adenocarcinoma del polmone. Inoltre, una forte associazione di SCD1, β-catenina e *birc5* si associa a una prognosi infausta. L'immunoistochimica di pazienti con adenocarcinoma del polmone mostra che SCD1 è co-espresso con YAP/TAZ e β-catenina, confermando una chiara correlazione tra l'espressione e l'attività di questi geni. Al fine di rafforzare il valore prognostico di SCD1/β-catenina/YAP/TAZ/*axin2* nel tumore al polmone e in altri tumori solidi sono necessari ulteriori studi.

Una questione che rimane aperta è l'identificazione del meccanismo principale di up-regolazione di SCD1 in CSCs di polmone. In questo contesto, è interessante osservare che il *pathway* del Mevalonato, attraverso SREPB induce biosintesi di geranylgeranyl transferasi e attivazione della GTPase Rho, è già dimostrato nell'attivazione di YAP/TAZ (Sorrentino et al., 2014). In questo caso, è possibile prevedere che nelle cellule tumorali del polmone YAP/TAZ può essere attivato da quattro vie distinte: a) mevalonato-SPREBP-geranylgeranyl-Rho GTPase; b)

SREPB-SCD1-  $\beta$ -catenina (come in questo studio); c) la down-regolazione dell'espressione dei LATS1/1 e la riduzione della fosforilazione; d) la down-regolazione del soppressore tumorale LKB1 (Figura 15 c) (S. Piccolo et al., 2014; Stefano Piccolo et al., 2013; Sorrentino et al., 2014). Il modo in cui i *pathway* comunicano ogni volta e come contribuiscono allo sviluppo del tumore al polmone è un importante questione da approfondire al fine di definire il miglior approccio terapeutico per le CSCs di polmone.

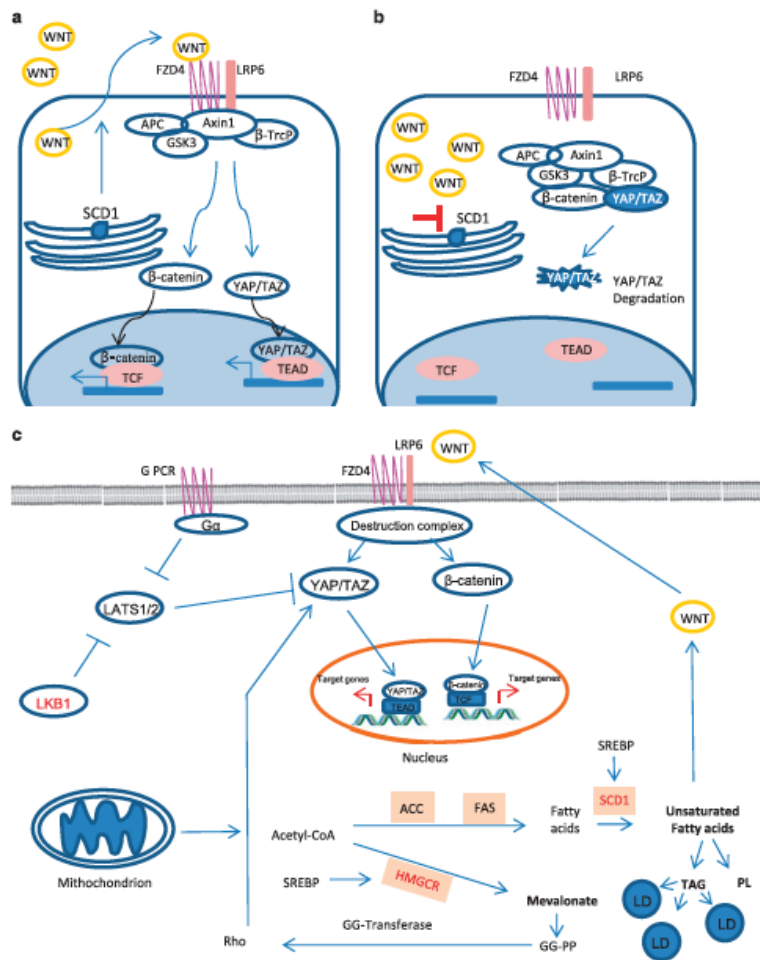


Figura 15. L'attività di SCD1 è richiesta per la stabilizzazione di YAP/TAZ in cellule 3D di polmone. (a) SCD1 induce il rilascio di *Wnt*, che a sua volta, attivando FDZ4 e LRP6, che libera  $\beta$ -catenina e YAP/TAZ dal destruction complex, causandone la traslocazione e l'accumulo a livello nucleare e l'attivazione trascrizionale dei geni target specifici. (b) Nel momento in cui SCD1 è inibito il rilascio di *Wnt* è alterato,  $\beta$ -catenina viene trattenuta dal complesso di degradazione e YAP/TAZ sono degradati. (c) L'ipotesi che della regolazione di YAP/TAZ nelle CSCs di polmone sono raffigurati in 4 meccanismi: a) Mevalonato-SPREBP-geranylgeranyl-Rho GTPase; b) SREPB-SCD1- $\beta$ -catenina; c) downregolazione dell'espressione di LATS1/2 attraverso il recettore della proteina G (GPCR); d) down-regolazione del soppressore tumorale LKB1.





NCI-H460 è stata selezionata per gli esperimenti successivi. È stata effettuata la cinetica per valutare l'espressione di SCD1 mediante RT-PCR, Western Blot in cui si osserva che dopo 96 ore di coltura in 3D si ha la maggiore espressione di SCD1. Il dato è confermato dall'attività del marcatore di staminalità ALDH1A1 mediante FACS analysis.

## 5.3 Caratterizzazione della regione del promotore di SCD1

### 5.3.1 Analisi Bioinformatica

Nell'uomo, il gene di SCD1 è collocato sul cromosoma 10 (chr10: q24.31), è composto da 6 esoni che formano un trascritto di 5,362 bps ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Allo scopo di verificare l'esistenza dei TFBS sul promotore di SCD1, è stata selezionata la regione genomica compresa -961/+1 bp dal sito d'inizio della trascrizione (5'UTR) usando i database: ProScan v1.7; *Genome Browser* e biogrid-LASAGNA. I TFs individuati potrebbero assumere un ruolo cruciale nella regolazione dell'espressione di SCD1 nel tumore al polmone, e sono: SREBP1, NF-YA, NF-YB, c-MYC e NF-κB. L'analisi bioinformatica ha permesso di individuare i putativi siti di legame altamente conservati dei TFs, le sequenze TATA box e CAAT box, oltre alla presenza di elementi regolatori associati alla RNA polimerasi II. I potenziali TFBS stati identificati usando dati di bioinformatica di ChIP-seq ([www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu)). Il *tool* di *Genome Browser* fornisce informazioni di ChIP-seq ([www.genome.ucsc.edu/](http://www.genome.ucsc.edu/)) ottenute analizzati i picchi di 161 TFs, derivante da 91 tipi di cellule, combinati in cluster per produrre una schematizzazione che mostra le regioni di occupazione per ogni fattore trascrizionale sul genoma (Bailey et al., 2013; Ma & Wong, 2011). L'algoritmo professionale, utilizzato per la predizione dell'allineamento dei TFBS, è stato effettuato con LASAGNA (length-Aware Site Alignment Guided by Nucleotide Association) SEARCH 2.0 ([http://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna\\_search/](http://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna_search/)) (Lee & Huang, 2014). L'algoritmo si basa sull'ipotesi che i siti di legame di un TFs condividono una breve sequenza altamente conservata (Lee & Huang, 2013). La sequenza del promotore di SCD1 collocata sul chr10: 100,347,124-100,364,834 è presente in GenBank® Nucleotide Sequence Database tramite numero identificativo AF320307 (Figura 17).

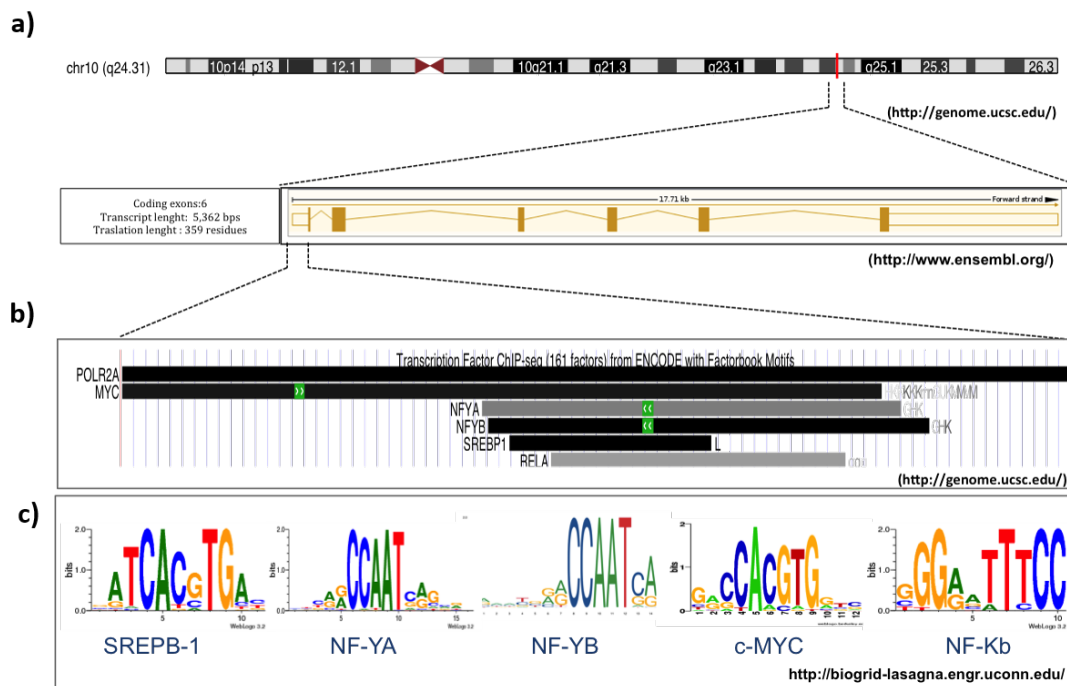


Figura 17. Analisi bioinformatica predittiva dei siti di legame dei fattori trascrizionali sul promotore di SCD1. (a) Il gene di SCD1 è localizzato sul cromosoma 10 (chr10:100,347,124-100,364,834). Con il database bioinformatici (<http://genome.ucsc.edu/> e [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) è stato osservato che il gene di SCD1 è lungo 17,71 Kb, è composto da 6 esoni che formano un trascritto di 5,362 bps e una proteina di 359 residui. (b) Dati di ChIP-seq presenti su *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) sul promotore di SCD1 (chr10: q24.31) individuano i TFs: SREBP1, NF-YA; Analisi dei siti di legame dei Fattori Trascrizionali sul promotore di SCD1.

Per la caratterizzazione funzionale del promotore del gene SCD1, in particolare, per identificare i TFBS cruciali per la regolazione di SCD1 è stata utilizzata la linea stabile di adenocarcinoma del polmone NCI-H460. Per validare i putativi TFBS è stata utilizzata la tecnica dell'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) nelle due condizioni di 2D e 3D di coltura. Le prime prove sperimentali sono volte alla messa a punto del protocollo d'immunoprecipitazione, nello specifico nella fase di sonicazione poiché le due condizioni di coltura presentano dei tempi differenti di frammentazione della cromatina. Infatti, per ottenere frammenti di 200-500 bp, le cellule 3D hanno necessità di ulteriori 10 cicli di sonicazione rispetto alle cellule in 2D, perché gli sferoidi sono caratterizzati da una membrana cellulare più spessa (Figura 18 a). Prima di procedere con la ChIP per i TFs identificati, è stato indispensabile verificare l'attività trascrizionale della regione del promotore selezionata nella linea NCI-H460. I risultati ottenuti mostrano sotto forma d'istogramma, l'arricchimento cromatinico normalizzato rispetto all'Input e alle IgG, nel nostro modello biologico. Per questo motivo sono stati analizzati, mediante qPCR, i livelli di arricchimento cromatinico di RNA polimerasi II in 5 porzioni di promotore (PR): PR\_1 (-921/-767), PR\_2 (-767/-

453); PR\_3 (-451/-225); PR\_4 (-271/-117); PR\_5 (-135/-1). Il controllo negativo è rappresentato da IR (chr10:134795784-134796529) (Figura 18 b). È stata effettuata la ChIP per la Polimerasi II, necessaria per constatare e misurare l'attività trascrizionale nella regione del promotore di SCD1.

Nella condizione di coltura in 3D, l'analisi mostra un'intensa attività trascrizionale nella sequenza genomica target. L'analisi di ChiP anti-H3K4me3 ha lo scopo di studiare le modificazioni istoniche correlate all'attività trascrizionale nelle due condizioni di coltura. Complessivamente, i risultati ottenuti dell'analisi dell'arricchimento cromatinico mostrano una struttura cromatinica accessibile ai complessi trascrizionali, in entrambe le condizioni di coltura, in tutta la regione di promotore studiata. Il profilo epigenetico legato all'arricchimento per H3K4me3 è associato ad un aumento di trimetilazione della cromatina nella condizione in 3D nella PR\_3. I risultati riconducibili all'apertura cromatinica, ottenuti tramite ChIP anti-Polimerasi II ed anti-H3K4me3, è tale da confermare un'intensa attività trascrizionale nella regione del promotore di SCD1 nelle condizioni di coltura in 2D e in 3D (Figura 18 c).

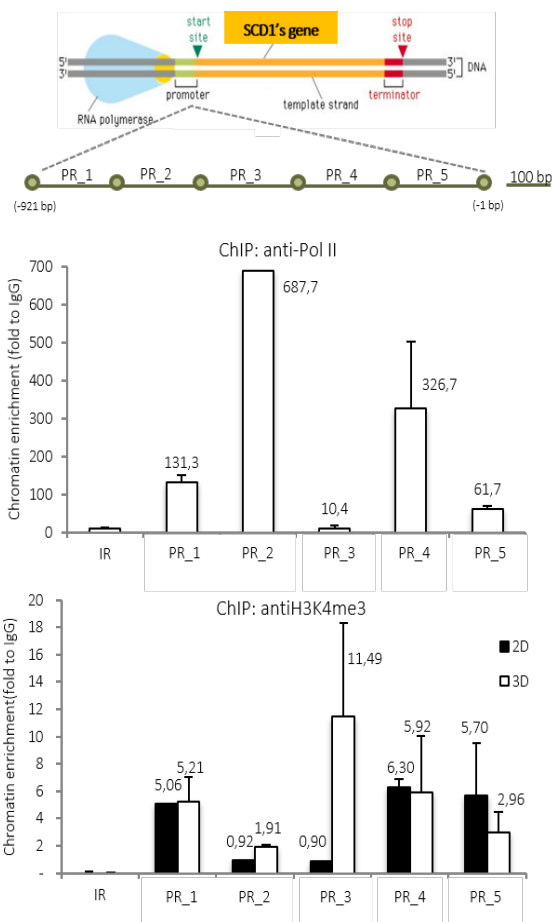
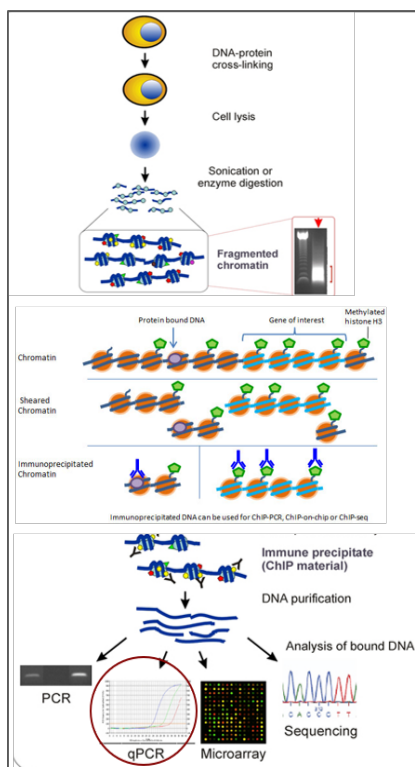


Figura 18. Approccio allo studio dei TFBS in cellule 2D e 3D di adenocarcinoma del polmone. (a) Schema del protocollo eseguito per l'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) e dell'analisi dell'arricchimento della cromatina mediante qPCR. (b) Schema della suddivisione della sequenza del promotore (-921/-1 bp) in cinque regioni (PR) per effettuare l'analisi della ChiP mediante qPCR. (c) Analisi dell'arricchimento della cromatina per valutare l'attività trascrizionale della regione del promotore selezionata, mediante ChiP anti-Pol II in cellule 3D, utilizzando il promotore della GAPDH come regione intergenica (controllo negativo). Mentre, la ChiP anti-H3K4me3 è stata effettuata in cellule cresciute in condizioni di 2D e 3D ed è stata scelta la regione telomerica del cromosoma 10 come regione intergenica (IR) o controllo negativo. L'esperimento è stato ripetuto in duplicato.

Allo scopo di valutare se i TFs presentano dei siti di legame sulla sequenza del promotore di SCD1, sono state eseguite le ChIP per SREBP1c, NF-YB, NF-YA, NF-kB e c-MYC, e analizzate le cinque regioni in cui è stato suddiviso il promotore, tramite qPCR. La ChIP, effettuata con l'anticorpo che riconosce la proteina SREBP1c, mostra un arricchimento cromatinico del fattore trascrizionale in 2 porzioni (PR\_1 e PR\_3) esclusivamente nella condizione di coltura in 3D (Figura 19 a). L'arricchimento della cromatina misurato per NF-YB è presente esclusivamente nella condizione di coltura in 2D (PR\_1 e PR\_2) (Figura 19 b). Al contrario, NF-YA ha dei potenziali siti di legame nelle zone del promotore PR\_2 e PR\_5 nelle cellule 3D (Figura 19 c). La validazione della ChIP anti-NF-kB mostra una situazione piuttosto eterogenea, poiché presenta due porzioni di arricchimento cromatinico nelle cellule 3D (PR\_1 e PR\_3) e un'unica porzione in cui ci sono siti di legame del TF sulle cellule 2D (PR\_5) (Figura 19 d). Infine, è stata comparata l'analisi dei livelli cromatinici per c-MYC delle 2D vs 3D, da cui è possibile osservare che entrambe le condizioni di coltura hanno dei siti di legame sul promotore di SCD1, ma le cellule 3D mostrano un arricchimento preponderante rispetto alle 2D e agli altri TFs (Figura 19 e).

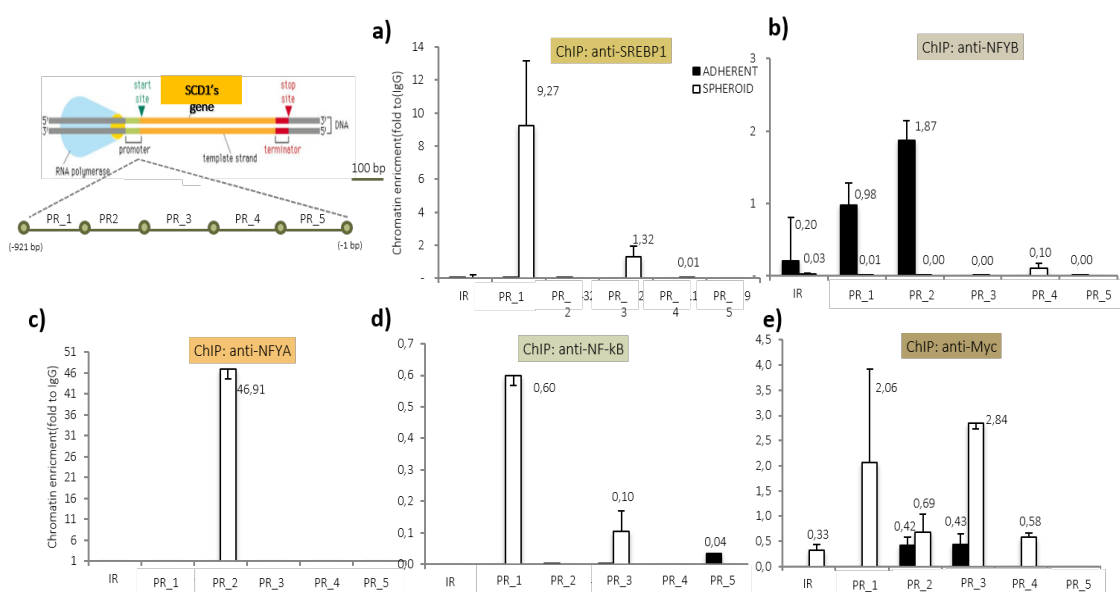


Figura 19. ChIP qPCR dei Fattori Trascrizionali nella linea stabile NCI-H460 in condizioni di coltura in 2D e 3D. (a) Analisi dell'arricchimento della cromatina per valutare l'attività trascrizionale della regione del promotore mediante ChIP anti-SREPB1c in cellule cresciute in condizioni di 2D e 3D. (b) ChIP qPCR anti-NF-YB mostra arricchimento cromatinico esclusivamente in cellule cresciute in condizioni di 2D. (c) ChIP qPCR anti-NF-YA presenta l'arricchimento del TF sulla cromatina solamente in cellule cresciute in condizioni di 3D. (d) ChIP qPCR anti-NF-kB mostra arricchimento cromatinico sono in cellule cresciute in condizioni di 2D e 3D. (e) ChIP qPCR anti-c-MYC mostra arricchimento della cromatina eterogeneo sia in cellule cresciute in condizioni di 2D che in 3D. La regione intergenica (IR) o controllo negativo è stata scelta la regione telomerica del cromosoma 10 (chr10:134795784-134796529). (f) Schema riassuntivo della ChIP qPCR in cui si evidenzia il notevole arricchimento della cromatina nella condizione di coltura in 3D rispetto alla 2D. Sono individuabili i TFs e il corrispondente valore dell'arricchimento cromatinico eseguito mediante ChIP qPCR. L'esperimento è stato ripetuto in duplicato.

Considerando i dati ottenuti per ChIP qPCR sulla linea NCI-H460, in condizioni di coltura in 2D e in 3D, è possibile osservare un notevole e significativo arricchimento cromatinico dei siti di legame dei fattori trascrizionali, SREPB1, NF-YA e c-MYC, nella regione del promotore di SCD1 nella condizione in 3D (Figura 19 f).

### **5.3.2 Il silenziamento genico dei Fattori Trascrizionali modula l'espressione di SCD1 in cellule 2D di adenocarcinoma del polmone**

Alla luce dei dati ottenuti dall'analisi delle ChIP e, allo scopo di comprendere meglio il ruolo dei singoli TFs nella regolazione trascrizionale di SCD1, il progetto di Dottorato è stato indirizzato verso un approccio volto a ridurre l'espressione dei singoli TFs in maniera transiente attraverso il silenziamento genico. Gli esperimenti sono stati eseguiti trasfettando le cellule con siRNA (*small interfering RNA*), sia nelle condizioni di coltura in 2D che in 3D nella linea stabile NCI-H460 di adenocarcinoma del polmone.

Le cellule 2D, silenziate per ogni singolo TFs, sono state osservate al microscopio sia per captare delle alterazioni a livello morfologico che per valutare la proliferazione cellulare. Si denota una diminuzione della crescita cellulare, prevalentemente nel silenziamento genico per NF-YA e SREPB1 (Figura 20 a). Successivamente, è stata valutata l'espressione genica di SCD1 mediante RT-PCR. L'analisi dei livelli di mRNA mostra la riduzione dell'espressione di SCD1 nelle cellule depletate per SREBP1, NF-Y (-YA e -YB) rispetto al controllo (*scramble*), ma non si osserva alcuna variazione nelle cellule silenziate per c-MYC, al contrario, si assiste ad un aumento dei livelli di messaggero (Figura 20 b). Parallelamente, tramite Western Blot, sono stati misurati i livelli proteici di

SCD1 mediante cui è possibile osservare una diminuzione dell'espressione proteica prevalentemente legata al silenziamento di SPREB1 (Figura 20 c).

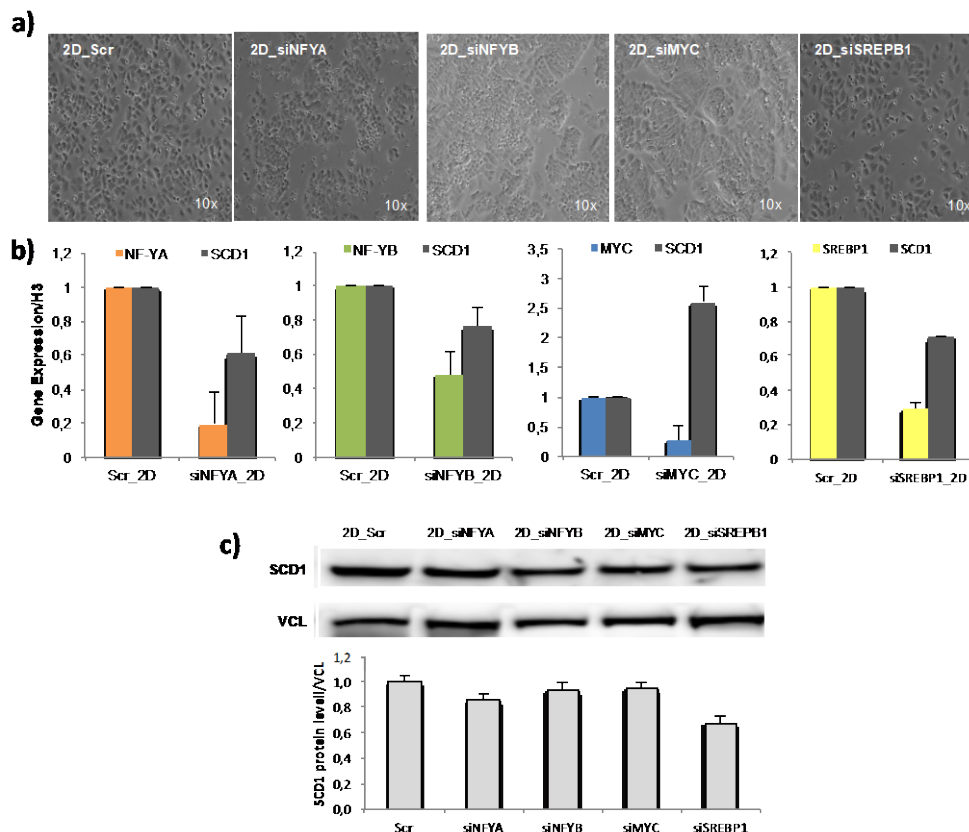


Figura 20. Silenziamento genico dei Fattori Trascrizionali nella linea stabile NCI-H460 in condizioni di coltura in 2D. (a) Immagine rappresentativa delle cellule 2D in cui si osserva una riduzione della proliferazione nelle cellule silenziate per SPREBP1 e NF-YA rispetto al controllo (scramble). (b) Analisi di RT-PCR dei livelli di mRNA di SCD1 in cui si evince una riduzione dell'espressione genica nelle cellule trasfettate con siRNA dei TFs, tranne che per il siMYC. L'espressione relativa è calcolata rispetto all'espressione del trascritto H3, usato come normalizzatore. (c) Western Blot raffigurante i livelli proteici di SCD1 in cui è possibile osservare una diminuzione dell'espressione proteica per il silenziamento di SREBP1, come mostrato nella densitometria. La Vinculina è stata usata come normalizzatore di caricamento. I dati mostrati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti.

### 5.3.3 Il silenziamento genico dei Fattori Trascrizionali modula l'espressione di SCD1 in cellule 3D di adenocarcinoma del polmone

L'identificazione dei TFs cruciali per la regolazione trascrizionale di SCD1 nelle CSCs rappresenta il focus del progetto, a tal fine, sono stati osservati gli effetti della riduzione dell'espressione transiente di SREBP1, NF-YA, NF-YB e c-MYC in cellule 3D. Le cellule 3D trasfettate con i siRNA specifici per ogni fattore trascrizionale mostrano un'alterazione dell'aspetto morfologico rispetto alle cellule 3D di controllo (scr), poiché il silenziamento genico di SREPB1, NF-YA e

in parte anche NF-YB si esplica con la riduzione della capacità di formazione degli sferoidi, e la perdita della caratteristica architettura cellulare (Figura 21 a). L'efficienza di formazione degli sferoidi è stata valutata rapportando il numero di cellule 3D formate, dalle cellule silenziate per i TFs rispetto alle cellule di controllo. In linea con questi risultati si assiste ad una significativa riduzione dei livelli di mRNA di SCD1 nelle cellule si\_SREBP1, si\_NF-YA e di\_NF-YB rispetto al controllo (scramble), ma non nelle silenziate per c-MYC (Figura 21 b). Gli effetti del silenziamento genico dei TFs si riflettono anche sull'espressione proteica di SCD1, infatti, i livelli proteici tendono a diminuire nelle cellule 3D trasfettate rispetto al controllo, soprattutto dopo il silenziamento di SREBP1 (Figura 21 c). Il saggio di vitalità cellulare fornisce delle informazioni sulle cellule 3D metabolicamente attive, e misura una forte diminuzione della vitalità in cellule 3D in cui è stata ridotta in maniera transiente l'espressione di SREBP1, NF-YA e YB rispetto al controllo 3D (Figura 21 d). Complessivamente, i risultati ottenuti suggeriscono che SREBP1 e NF-Y sono necessari per formazione e vitalità delle cellule 3D e possono essere coinvolti nella regolazione trascrizionale di SCD1 in CSCs.

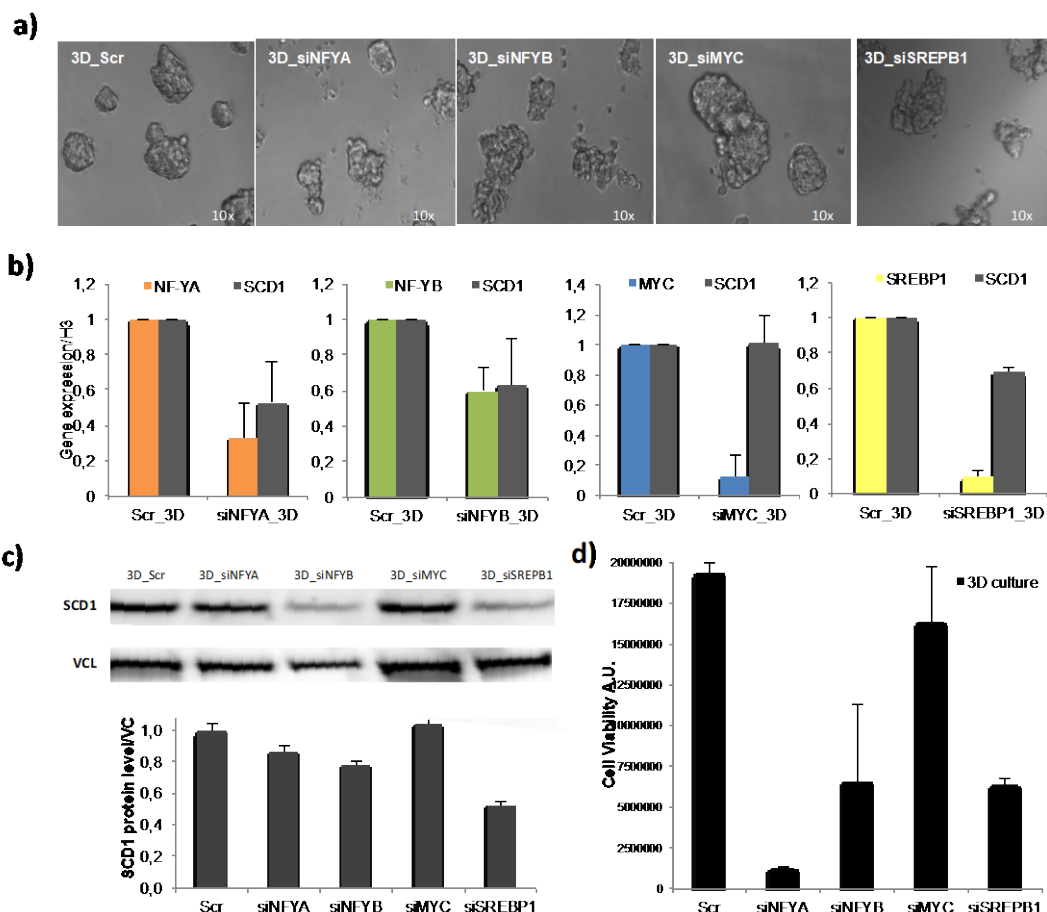


Figura 21. Silenziamento genico dei Fattori Trascrizionali nella linea stabile NCI-H460 in condizioni di coltura in 3D. (a) Immagine rappresentativa delle cellule in 3D in cui si osserva una perdita della capacità di formazione degli sferoidi nelle cellule silenziate per SPREBP1, NF-YA e NF-YB rispetto al controllo (scramble). (b) RT-PCR effettuata per misurare i livelli di mRNA di SCD1 in cui si osserva una riduzione dell'espressione genica nelle cellule silenziate tranne che per le cellule si\_MYC. L'espressione relativa è calcolata rispetto all'espressione del trascritto H3, usato come normalizzatore. (c) Analisi di Western Blot in cui è possibile osservare una diminuzione dell'espressione proteica di SCD1 soprattutto per il silencing di SREBP1, come mostrato nella densitometria. La Vinculina è stata usata come normalizzatore di caricamento. (d) Saggio di vitalità cellulare in 3D silenziate o meno per i Fattori Trascrizionali normalizzati rispetto al controllo (scramble). I dati mostrati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti.

## 5.4 Mutagenesi del promotore di SCD1 mediante il sistema CRISPR/Cas9

### 5.4.1 Generazione dei vettori contenenti sgRNA e dei cloni

La mutagenesi della regione del promotore di SCD1 prevede la costruzione di vettori pSpCas9n(bb)-2a-puro esprimenti il gene che codifica per l'endonucleasi Cas9, a cui sono legati i sgRNA. Attraverso l'utilizzo del protocollo del laboratorio di Zhang è stato possibile integrare ogni singolo inserto di sgRNA all'interno di pSpCas9n(bb)-2a-puro, al fine di ottenere tre vettori indipendenti, contenenti sgRNA1, sgRNA2 e sgRNA3, necessari per la delezione di due porzioni target di una sequenza del promotore di SCD1 localizzato sul cromosoma 10 (chr10: q24.31) (Figura 22). La tecnologia CRISPR/Cas9 ha messo nelle condizioni di indurre la mutagenesi nella porzione PR\_1 (-928/-716) e nella porzione PR\_2 (-716/-409) del promotore di SCD1, in cui si osserva il principale switch dei TFBS nel passaggio di coltura di cellule da 2D a 3D, osservati per ChIP-qPCR (Figura 19).

```

>SCD1 PROMOTER (-961)
                                sgRNA1
GCAGGTGCCAGAACATTCTCTGGCCTAACTGGCCGGTACCAGAGCCATTGTTCGCAGGGCGTACCAGCCCCCG
      primer_forward
CGCTCGCCCGGGAGGGAGGGCGGGGCTTCCCGCGTCCCCAAGCTCCAGATCCTGGGGTGGCTGCCACGTCTCCCT
GCCACGCGCCTGGGGGACGGGAAGACGGGACGGAGATGTTAGTGGTGGCGCCCCCGAGGGTTCACCACTG
      sgRNA2
TTTCCTGAGAAACTTCCCCAGTGCCCACCCACCCGTTCTCCGTGTGCCCGAGGGCCGGTCTCTGGGCTAGGCTCCG
CGCCCCAGCCCCAACCCGGTCCCCAGCCCTTCCAGAGAGAAAGCTCCCGACGCGGGATGCCGGGCAGAGGC
CCAGCGCGGGTGAAGAGAAGCTGAGAAGGAGAAACAGAGGGAGGGGAGCGAGGAGCTGGCGGCAGAGG
GAACAGCAGATTGCGCCGAGCCAATGGCAACGGCAGGACGAGGTGGCACCAAATCCCTTCGGCCAATGACGAGC
      sgRNA3
CGGAGTTTACAGAAGCCTCATTAGCATTCCCCAGAGGCAGGGGCAGGGGCAGAGGCCGGGTGGTGTGGTGTGCG
GTGTCCGGCAGCATCCCCGGCGCCCTGCTGCGGTGCGCCGAGCCCTCGGCTCTGTCTCTCTCCCCCTCCCGCCCT
TACCTCCACGCGGGACCGCCGCGCCAGTCAACTCCTCGCACTTTGCCCTGCTTGGCAGCGGATAAAAGGGGGC
TGAGGAAATACCGGACACGGTCAACCGTTGCCAGCTCTAGCCTTTAAATCCCGGCTCGGGGACCTCCACGCACCG
CGGCTAGCGCCGACAACCAGCTAGCGTGCAAGGCGCCGCGGCTCAGCGCGTACCGGCGGGCTTCCAAACCGCAG
TCCTCCGGCGACCCGAACCTCCGCTCCGGAGCCTCAGCCCCCTGAAAGTGATCCCGGCATCCGAGAGCCAATGC
ACTAGGCGCGTAGGCTCTCGAAAGCTTGCAATCCGGTACTGCCAGTCAAAGGCCACCATGGAA
      primer_reverse

```



Figura 22. Immagine rappresentativa della sequenza del promotore di SCD1, in cui è stata effettuata mutagenesi con il sistema CRISPR/Cas9. Sono riportate le sgRNA1, sgRNA2 e sgRNA3 sugli inserti in cui l'endonucleasi Cas9 effettuerà il taglio. Nell'immagine sono specificati i primers utilizzati per eseguire il controllo dell'avvenuta mutagenesi mediante PCR.

La sequenza PR\_1 presenta il maggior arricchimento cromatinico per i siti di legame di SREPB1 nelle cellule 3D, in linea con i numerosi studi che dimostrano come SCD1 sia il target principale di SREPB1 (Mancini et al., 2018; Miyazaki et al., 2004). Tramite la generazione di vettori contenenti gli inserti sgRNA è stata eseguita la doppia trasfezione con i plasmidi, contenenti sgRNA1, sgRNA2. Considerando i dati ottenuti per ChIP-qPCR, è stato interessante approfondire un probabile effetto legato allo switch dei TFs, NF-YB e NF-YA, nel passaggio da cellule in 2D a 3D mediante la mutagenesi della sequenza PR\_2.

Tramite la generazione di vettori contenenti gli inserti sgRNA è stata eseguita la doppia trasfezione con i plasmidi, per ottenere la mutagenesi nelle porzioni PR\_1 e PR\_2, contenenti rispettivamente sgRNA1+sgRNA2 e sgRNA2+sgRNA3, all'interno delle cellule della linea stabile NCI-H460 di adenocarcinoma del polmone. Il passaggio successivo prevede la selezione dei cloni contenenti sia pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA1 che pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA2, per la PR\_1, che pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA2 e pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA3 per la PR\_2, con l'agente selettivo puromicina (2 µg/ml) al fine di propagare i cloni aventi le delezioni predette (Figura 23 a,b). Prima di procedere con l'osservazione del fenotipo dei mutanti ottenuti con il sistema CRISPR/Cas9, è stato necessario il passaggio di controllo dell'avvenuta mutagenesi dei prodotti di PCR su gel di agarosio (1%). Il DNA è stato amplificato utilizzando una coppia di oligonucleotidi disegnati esternamente alla sgRNA1 e alla 5'UTR del promotore del gene SCD1. La presenza di un amplicone di 981 bp corrisponde all'interno amplificato della regione di promotore, ossia il campione WT.

I prodotti di PCR con altezze inferiori sono associati ai cloni ottenuti dalla mutagenesi della porzione PR\_1Δ e PR\_2Δ, rispettivamente di 769 bp e 674 bp (Figura 23 c). Il sequenziamento genico ha confermato la presenza della delezione all'interno della sequenza del promotore di SCD1.

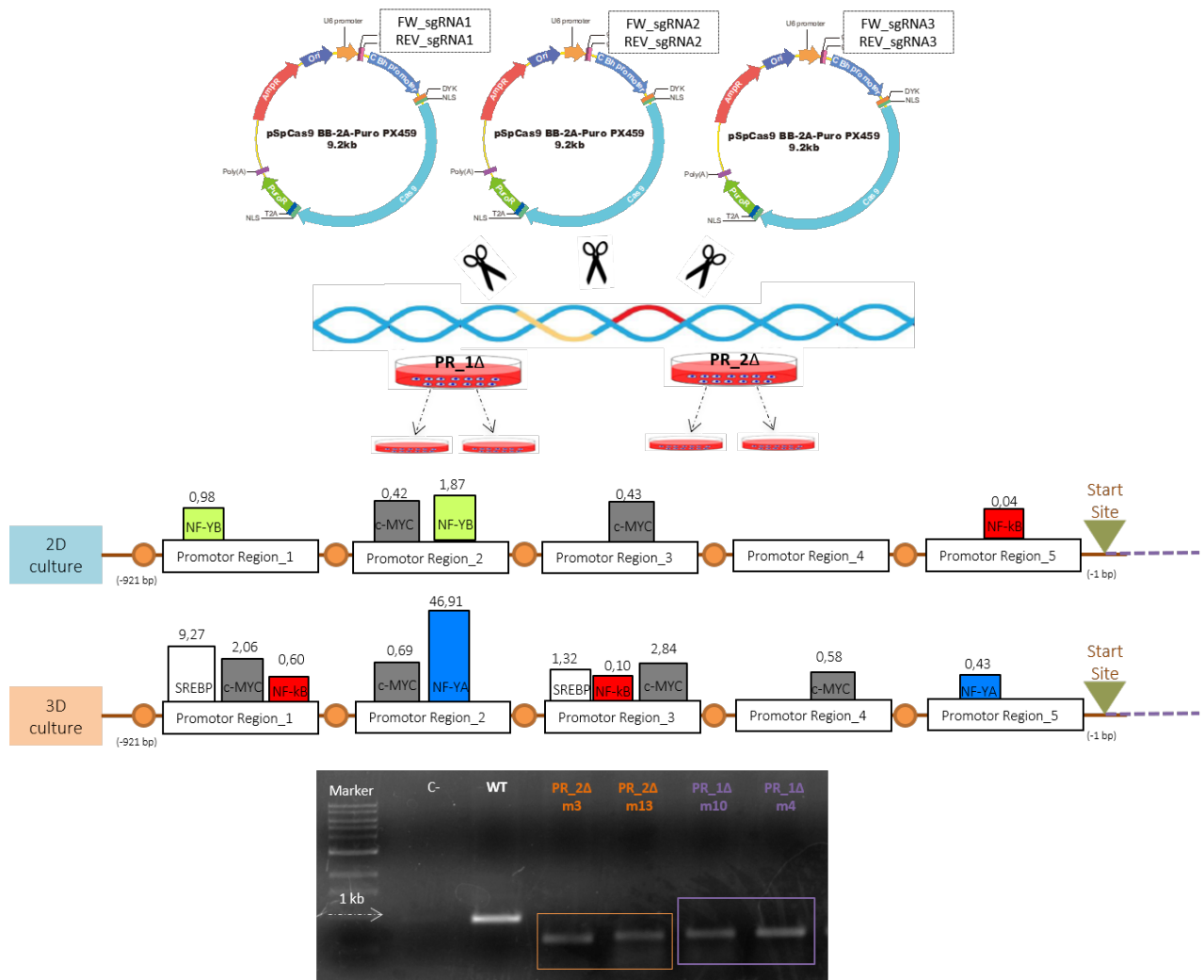


Figura 23. Costruzione dei plasmidi pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA per la mutagenesi del promotore del gene SCD1. (a) Immagine rappresentativa del vettore pSpCas9n(bb)-2a-puro in cui vengono legati gli inserti sgRNA specifici e trasfettati nella linea stabile NCI-H460. (b) Schema rappresentativo dei TFBS del promotore di SCD1 in condizioni di 2D e 3D, e delle porzioni target PR\_1 e PR\_2 in cui è effettuata la delezione utilizzando rispettivamente sgRNA1+sgRNA2, e sgRNA2+sgRNA3. (c) Immagine della corsa elettroforetica della PCR effettuata per il controllo della mutagenesi del promotore di SCD1.

#### 5.4.2 Caratterizzazione del clone PR\_1Δ ottenuto da pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA1 + pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA2

Al fine di studiare il fenotipo espresso dai cloni PR\_1Δ è stato necessario selezionare con la puromicina le cellule della linea stabile NCI-H460 trasfettate con i vettori pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA1 e pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA2 contemporaneamente. I vettori contengono il gene che codifica per l'endonucleasi Cas9, a monte degli inserti sgRNA, in grado di conferire la capacità di tagliare specificatamente la sequenza corrispondente a sgRNA1 e sgRNA2 di 212 bp, all'interno della regione del promotore di SCD1. L'avvenuta mutagenesi è stata confermata tramite reazione di sequenziamento genico. Sono stati eseguiti saggi funzionali per la valutazione e comparazione dell'espressione

di SCD1, confrontando la linea parentale con la mutata, sia in condizioni di coltura in 2D che in 3D. Le cellule aventi PR\_1 $\Delta$ , in condizione di adesione, mostrano un'alterata organizzazione cellulare e una diminuita proliferazione, misurata tramite saggi di clonogenici e di MTT, rispetto alle cellule 2D\_WT (Figura 24 a- c). L'espressione proteica di SCD1, nel clone mutato nella PR\_1 $\Delta$  non subisce alterazioni rispetto alle cellule 2D\_WT (Figura 24 d).

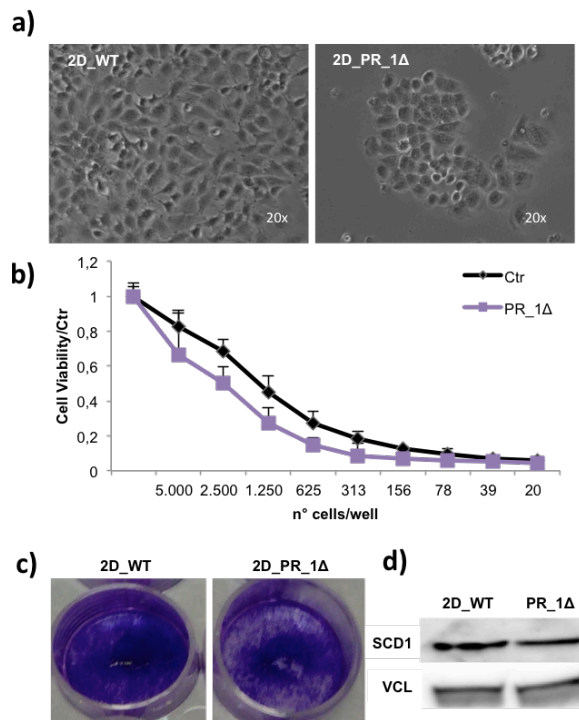


Figura 24. Caratterizzazione cloni 2D\_PR\_1 $\Delta$  ottenuti in seguito a mutagenesi effettuata con CRISPR/Cas9. (a) Immagini rappresentative delle cellule 2D\_WT e 2D\_PR\_1 $\Delta$ . (b) Si valuta la vitalità cellulare che risulta essere ridotta nelle cellule in cui è stata effettuata la mutagenesi rispetto al controllo, mediante saggio MTT. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. (c) Il saggio clonogenico mostra una diminuita proliferazione delle cellule 2D\_PR\_1 $\Delta$  rispetto 2D\_WT.

Allo scopo di studiare l'effetto della delezione PR\_1 $\Delta$  nell'ambito della regolazione trascrizionale di SCD1 sono state caratterizzate le cellule sferoidi. Nella condizione di coltura in 3D, gli sferoidi formati dai cloni contenenti la delezione nel PR\_1 $\Delta$  mostrano un'importante riduzione delle dimensioni e della vitalità cellulare rispetto al controllo (3D\_WT), misurata tramite il saggio di luminescenza *CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay* (

Figura 25 a,b). Coerentemente, le cellule 3D\_PR\_1 $\Delta$  mostrano una down-regolazione dell'espressione di SCD1 sia a livello genico che proteico, associato alla riduzione dei livelli di mRNA del marcatore di staminalità Oct4, rispetto al controllo 3D\_WT (

Figura 25 c). Nell'ottica di studiare il fenotipo dei cloni mutati con CRISPR/Cas9 è stato valutato il mRNA di FASN, per comprendere meglio le variazioni del metabolismo lipidico degli sferoidi privati dei siti di legame di SREPB1, c-MYC e NF-kB. L'analisi di RT-PCR mostra un aumento dei livelli trascrizionali di FASN, probabilmente attivati per un meccanismo compensatorio (Figura 25 d). In aggiunta, è stata osservata l'espressione di SCD1 per Immunofluorescenza, le cellule 3D\_PR\_1 $\Delta$  rispetto al controllo presentano una leggera diminuzione di espressione citoplasmatica di SCD1. Ciò che risulta apprezzabile è la diversa distribuzione di SCD1, che sembra accumularsi a ridosso della membrana cellulare (Figura 25 e). Alla luce dei risultati ottenuti, è possibile supporre che la diminuzione di espressione di SCD1 nel clone 3D\_PR\_1 $\Delta$  potrebbe essere associata ai siti di legame di SREPB1 e c-MYC, nel passaggio da coltura in 2D a 3D, osservati tramite CHIP q-PCR (Figura 19 f).

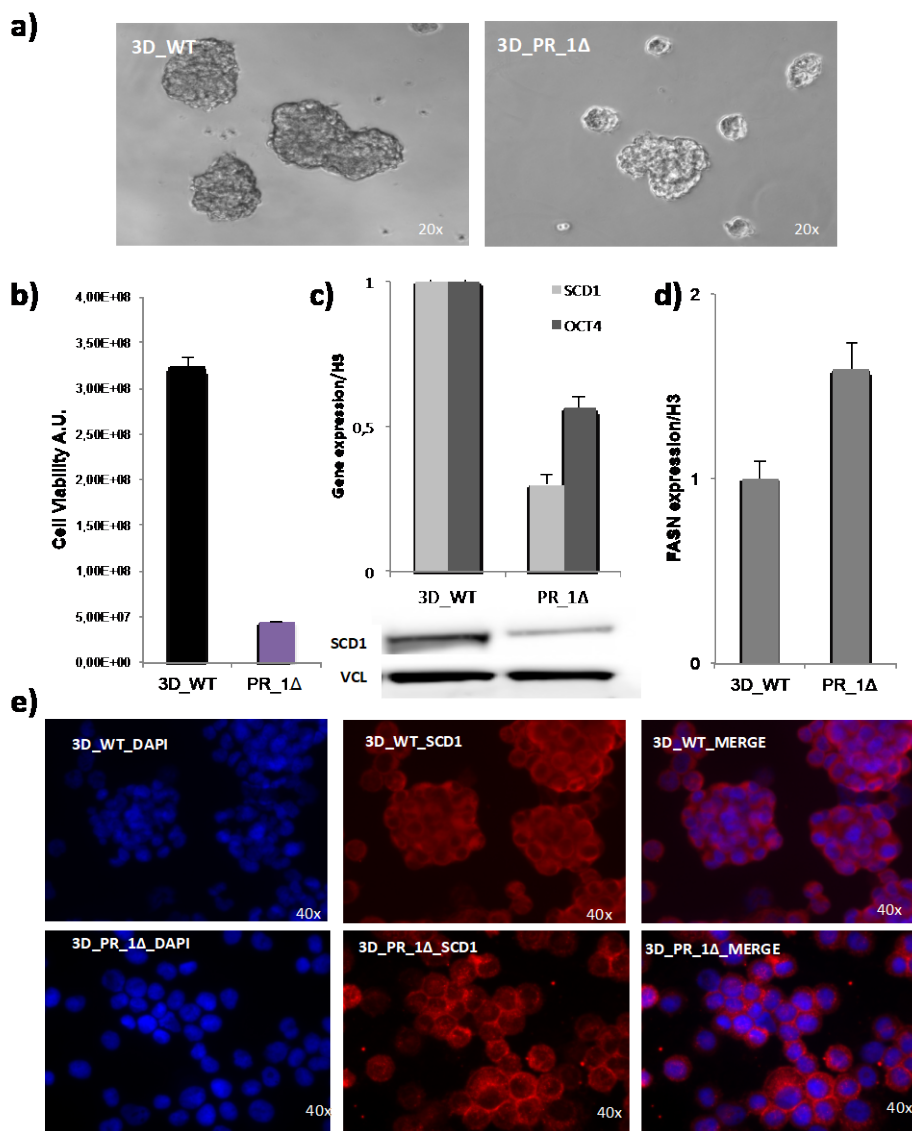


Figura 25. Caratterizzazione cloni 3D\_PR\_1Δ ottenuti in seguito a mutagenesi effettuata con CRISPR/Cas9 (a) Immagini rappresentative delle cellule 3D\_WT e 3D\_PR\_1Δ in cui si osserva una riduzione delle dimensioni degli sferoidi. (b) Misurazione della vitalità cellulare nei mutanti rispetto alle cellule 3D\_WT ottenuta mediante il saggio di luminescenza CellTiter Glo. (c) Analisi dei livelli di mRNA effettuata tramite RT-PCR, mostra una riduzione di espressione di SCD1 e Oct4 nei mutati ottenuti dalla delezione in PR\_1Δ rispetto al WT. L'espressione relativa è calcolata rispetto al trascritto H3, usato come normalizzatore. Il WB mostra la diminuita espressione proteica di SCD1 nel clone PR\_1Δ rispetto al controllo WT. La Vinculina è stata usata come normalizzatore. (d) Analisi dei livelli di mRNA di FASN, enzima coinvolto nella sintesi de novo degli acidi grassi. L'espressione relativa è calcolata rispetto al trascritto H3, usato come normalizzatore. (e) Immagini al microscopio rappresentative dell'IF condotta su cellule 3D\_WT e 3D\_PR\_1Δ per valutare l'espressione di SCD1. La colorazione dei nuclei è stata ottenuta tramite l'utilizzo del colorante Hoechst 33342. Nel merge sono mostrate le immagini sovrapposte per identificare la localizzazione di SCD1. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti.

#### 5.4.3 Caratterizzazione del clone PR\_2Δ ottenuto da pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA2 + pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA3

Per meglio caratterizzare il clone avente la delezione nella PR\_2Δ, le cellule della linea NCI-H460 sono state precedentemente trasfettate con i plasmidi pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA2 e pSpCas9n(bb)-2a-puro-sgRNA3 e sottoposte

a selezione con puromicina. Per individuare la presenza di TFs cruciali nella regolazione dell'espressione di SCD1 sulla regione PR\_2 $\Delta$ , sono state osservate le cellule nelle due condizioni di coltura. Nelle cellule in adesione, la delezione PR\_2 $\Delta$  non comporta modificazioni legate all'organizzazione e alla morfologia cellulare (Figura 26 a). Inoltre, la mutagenesi effettuata mediante CRISPR/Cas9 non mostra effetti sulla vitalità e proliferazione cellulare, misurata tramite saggio MTT e clonogenico (Figura 26 b,c).

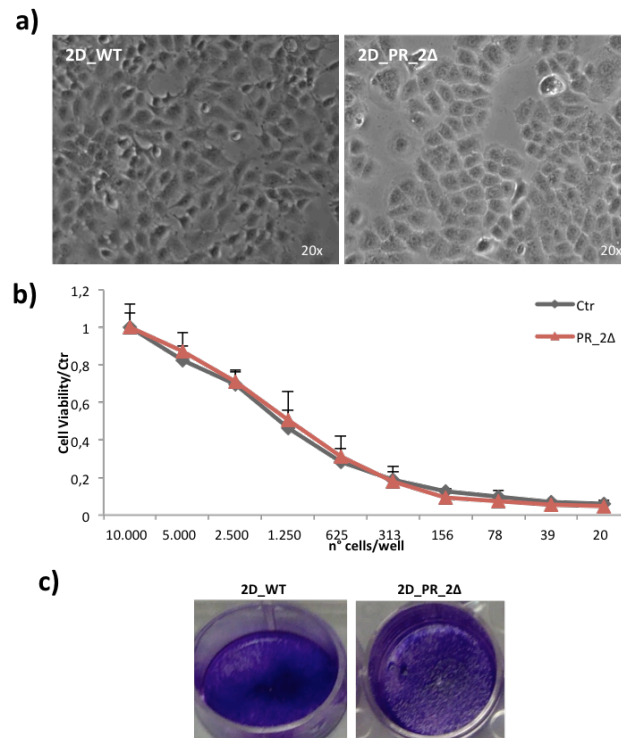


Figura 26. Caratterizzazione cloni 2D\_PR\_2 $\Delta$  ottenuti in seguito a mutagenesi effettuata con CRISPR/Cas9. (a) Immagini rappresentativa delle cellule 2D\_WT e 2D\_PR\_2 $\Delta$ . (b) Si valuta la vitalità cellulare delle WT e del clone in cui è stata effettuata, mediante saggio MTT. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. (c) Il saggio clonogenico non presenta una sostanziale variazione di proliferazione delle cellule 2D\_PR\_2 $\Delta$  rispetto 2D\_WT.

La mutagenesi della regione del promotore PR\_2 ha generato un clone caratterizzato dalla delezione dei siti di legame del fattore trascrizionale NF-YA nella condizione di coltura in 3D. Dall'osservazione microscopica delle cellule 3D\_WT e 3D\_PR\_2 $\Delta$  non appaiono sostanziali differenze a carattere morfologico e strutturale, ma una lieve diminuzione di vitalità cellulare (Figura 27 a,b). Inoltre, nel clone 3D\_PR\_2 $\Delta$ , si assiste ad un aumento dei livelli trascrizionali di SCD1, Oct4 e di FASN, che tuttavia non si traducono in un incremento dei livelli proteici di SCD1 (Figura 27 b-d). Un ulteriore effetto anomalo è osservabile nelle immagini di immunofluorescenza in cui il clone, 3D\_PR\_2 $\Delta$  mostra un'espressione di SCD1 non uniformemente citoplasmatica ma, piuttosto

accumulata a ridosso del nucleo (Figura 27 e). I dati ottenuti dalla caratterizzazione del clone PR\_2Δ saranno ulteriormente approfonditi e investigati, allo scopo di verificare se la regione target e i TFs NF-Y hanno un ruolo nella regolazione trascrizionale di SCD1 nelle CSCs.

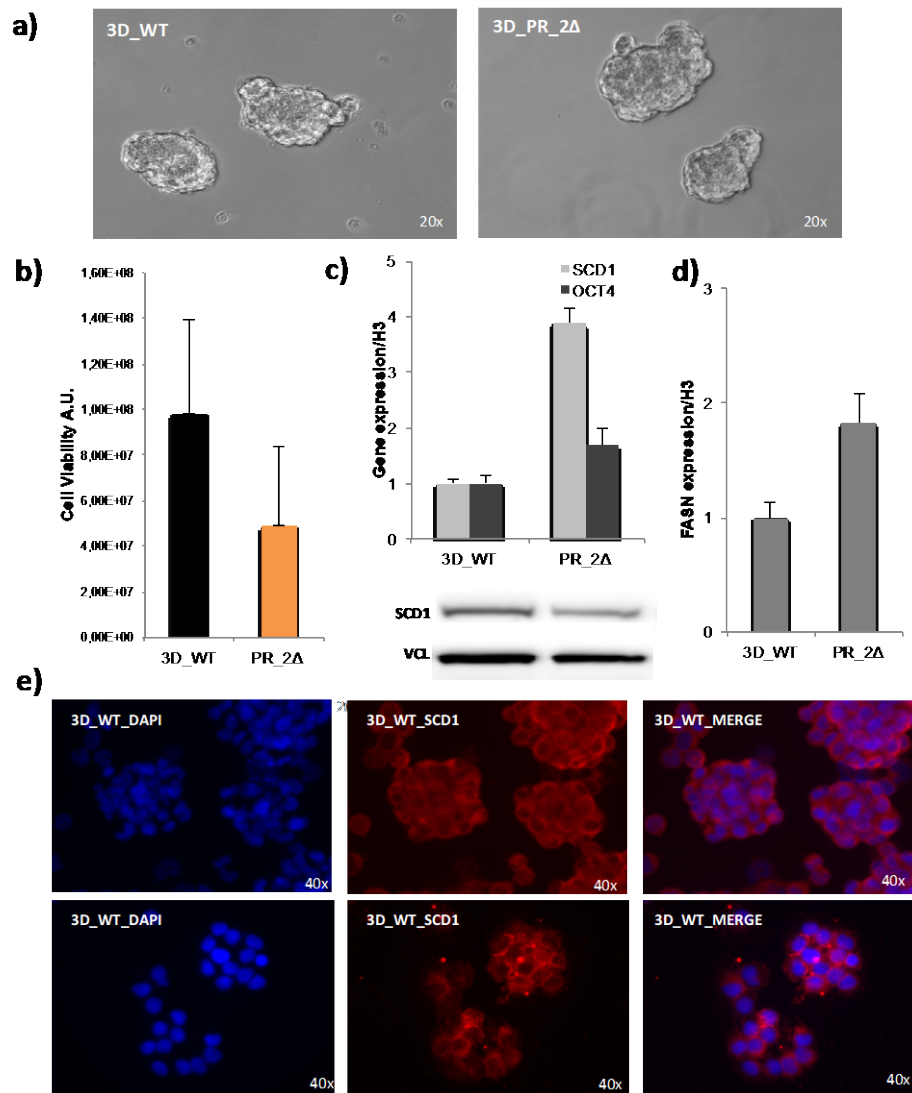


Figura 27. Caratterizzazione cloni 3D\_PR\_2Δ ottenuti in seguito a mutagenesi effettuata con CRISPR/Cas9. (a) Immagini rappresentative delle cellule 3D\_WT e 3D\_PR\_2Δ in cui non si osserva una variazione delle dimensioni o della struttura degli sferoidi. (b) Misurazione della vitalità cellulare nei mutanti rispetto alle cellule 3D\_WT ottenuta mediante il saggio di luminescenza CellTiter Glo. (c) Analisi dei livelli di mRNA effettuata tramite RT-PCR, mostra un aumento di espressione di SCD1, e di entità inferiore anche di Oct4 nei mutati ottenuti dalla delezione in PR\_2Δ rispetto al WT. L'espressione relativa è calcolata rispetto al trascritto H3, usato come normalizzatore. Il WB mostra la diminuita espressione proteica di SCD1 nel clone PR\_2Δ rispetto al controllo WT. La Vinculina è stata usata come normalizzatore. (d) Analisi dei livelli di mRNA di FASN, enzima coinvolto nella sintesi de novo degli acidi grassi. L'espressione relativa è calcolata rispetto al trascritto H3, usato come normalizzatore. (e) Immagini al microscopio rappresentative dell'IF condotta su cellule 3D\_WT e 3D\_PR\_1Δ per valutare l'espressione di SCD1. La colorazione dei nuclei è stata ottenuta tramite l'utilizzo del colorante Hoechst 33342. Nel merge sono mostrate le immagini sovrapposte per identificare la localizzazione di SCD1. I dati rappresentano la media ± SD di due esperimenti indipendenti.

## 6 Conclusione Parte II°

Il metabolismo lipidico è una delle caratteristiche delle alterazioni cellulari tumorali, identificate in molecole che giocano un ruolo nel controllo della proliferazione, invasività e soprattutto nelle CSCs. Lo studio del meccanismo di azione durante la trasformazione neoplastica è un interessante campo di ricerca per il trattamento dei tumori. Tuttavia, gli eventi molecolari alla base del controllo trascrizionale lipidico nelle cellule staminali nell'adenocarcinoma del polmone rimangono scarsamente conosciuti. L'importanza dei meccanismi necessari per controllare la regolazione genica e, in ultima analisi, il destino di una cellula è dimostrato dal loro coinvolgimento in diverse patologie umane. Infatti, molto spesso le variazioni dei siti di legame dei TFs sono in grado di modificare l'espressione genica e di attivare o inattivare specifici *pathway* coinvolti nell'insorgenza e nello sviluppo di neoplasie.

I risultati ottenuti durante il programma di Dottorato costituiscono le fondamenta per costruire la teoria, secondo la quale, è presente una dipendenza dell'attività trascrizionale di SREBP1, che unitamente a c-MYC e NF-κB, è necessaria nel mantenere la capacità di formazione degli sferoidi e l'over-espressione di SCD1 in CSCs. Il sistema biologico utilizzato per gli esperimenti è rappresentato dalla linea cellulare NCI-H460 di adenocarcinoma del polmone, scelta tra le altre linee stabili a disposizione poiché presenta elevati livelli di SCD1 e dei marcatori di staminalità nelle cellule 3D, è una linea tumorigenica, ha un'ottima capacità di formazione degli sferoidi (Noto et al., 2013). La serie di dati, conseguiti per ChIP-qPCR, fornisce un insieme d'informazioni contenute nella cromatina che indicano un meccanismo dinamico di legame dei TFs nel passaggio da cellule cresciute in condizione di aderenza a sferoidi. Inoltre, il sistema CRISPR/Cas9, individuato nei batteri come sistema immunitario di tipo adattativo, rappresenta attualmente uno strumento utile da impiegare nell'ambito del "*gene editing*" e della "*target therapy*". L'obiettivo di effettuare la mutagenesi sul promotore di SCD1, mediante CRISPR/Cas9, deriva dallo scopo di ottenere cloni stabili che indicassero la porzione di promotore efficiente e i TFs cruciali nella regolazione trascrizionale di SCD1 in CSCs. La tecnologia CRISPR/Cas9 è legata a problemi di "*off-target*" che causa diversi tipi di complicazioni, dal taglio su sequenze non specifiche, all'interruzione di geni o alterazioni nella proteina che viene successivamente codificata. Per questo motivo è stato necessario eseguire numerosi tentativi di



trasfezione, e verificare ogni volta l'avvenuta mutagenesi mediante sequenziamento genico, prima di ottenere la mutagenesi dei cloni desiderata. Sono stati eseguiti saggi funzionali per la valutazione e comparazione dell'espressione di SCD1, confrontando la linea parentale con la mutata. La delezione della porzione PR\_1 del promotore di SCD1, mediante CRISPR/Cas9 è caratterizzata dalla delezione di una porzione che influenza la regolazione di SCD1. Il clone 3D\_PR\_1 $\Delta$ , ottenuto dalla mutagenesi CRISPR/Cas9, riduce i livelli di espressione di SCD1, sia a livello genico che proteico, inoltre, è caratterizzato da una diminuzione di vitalità e capacità di formazione degli sferoidi, rispetto alle cellule WT. I risultati conseguiti lasciano supporre che il clone 3D\_PR\_1 $\Delta$  possa ricoprire un ruolo di regolatore trascrizionale nelle CSCs. La regolazione potrebbe essere attribuita ai siti di legame funzionali di SREBP1, c-MYC e NF- $\kappa$ B per SCD1 nelle CSCs di adenocarcinoma del polmone.

L'investigazione del sistema CSCs ha portato ad individuare due rilevanti paradigmi: l'arricchimento dei siti di legame dei Fattori Trascrizionali nelle cellule sferoidi rispetto alle aderenti e la mutagenesi di una porzione del promotore di SCD1 mediante il sistema CRISPR/Cas9.

Sulla base dei risultati ottenuti e forti del *background* del Gruppo, si pone come mandatorio sviluppare la linea di ricerca secondo la naturale prosecuzione: (i) studiare il coinvolgimento del *network* SREBP1/cMYC nella riprogrammazione del metabolismo lipidico all'interno della regolazione di SCD1 in CSCs (Y. Wu et al., 2016). (ii) Validare la connessione tra SREBP/NFY, che spiegherebbe la regolazione dei geni essenziali coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi e del colesterolo (Dolfini, Gatta, et al., 2012). (iii) Integrare le informazioni relative all'analisi di arricchimento cromatinico dei TFs e delle modificazioni istoniche del promotore di SCD1, nelle due condizioni di coltura. (iv) Superare le problematiche legate alla tecnologia CRISPR/Cas9, ottimizzando la delezione di specifici siti di legame di SREBP1 e/o c-MYC, cruciali per la regolazione trascrizionale di SCD1.

Una infinitesima luce è stata accesa nell'infinita ombra del carcinoma polmonare, luce che seppur minuta segue e sarà seguita da molte altre, nel costante lavoro di lotta verso il tumore.

## 6.1 Prospettive future: analisi genomica funzionale

I risultati ottenuti finora e le complesse informazioni contenute nella cromatina ci permettono di migliorare la conoscenza della regolazione trascrizionale genica di SCD1. Nell'ultima fase del percorso di Dottorato, l'attenzione si è focalizzata sulla necessità di ottenere un'analisi genomica funzionale all'interno del nostro sistema biologico. Le prospettive future si basano sull'analisi primaria di dati di ATAC-seq e RNA-seq, con lo scopo di identificare i segnali di attivazione e spegnimento della trascrizione di SCD1 in CSCs di adenocarcinoma del polmone. In collaborazione con l'Istituto Nazionale Tumori Regina Elena-IFO di Roma, sono stati analizzati i profili di apertura e accessibilità della cromatina, in cellule della linea stabile NCI-H460 in condizioni di coltura 2D e 3D, l'analisi bioinformatica è stata sviluppata per processare i dati di sequenziamento al fine di ottenere le posizioni accessibili del genoma per ciascuna condizione.

Nell'ambito del progetto di Dottorato, è stata analizzata la distribuzione spaziale di regioni aperte e chiuse, circostanziate alla porzione di genoma corrispondente al promotore di SCD1 (chr10: 100,347,124-100,364,834). Dati preliminari suggeriscono che, confrontando le cellule in adesione (ATAC\_2D) e in sferoidi (ATAC\_3D) non ci sia una sostanziale differenza, piuttosto, entrambe le condizioni di coltura presentano un grado di apertura cromatinica importante, indice di un'intensa attività trascrizionale. La Figura 28 permette di associare i dati ottenuti con ATAC-seq con le aree genomiche soggette a metilazione, nello specifico, la zona di promotore avente la cromatina aperta presenta bassi livelli di metilazione (H3K4me1) e di acetilazione (H3K27Ac) (Figura 28).

Per quanto concerne l'analisi genomica complessiva dello stato della cromatina, in cellule 2D e 3D di adenocarcinoma del polmone, dall'analisi *pipeline* emergono circa 10.000 zone modulate, di cui 1000 aree sono state identificate e selezionate, poiché fortemente modulate e arricchite in almeno una delle due condizioni sperimentali, che saranno oggetto di prossimi studi.

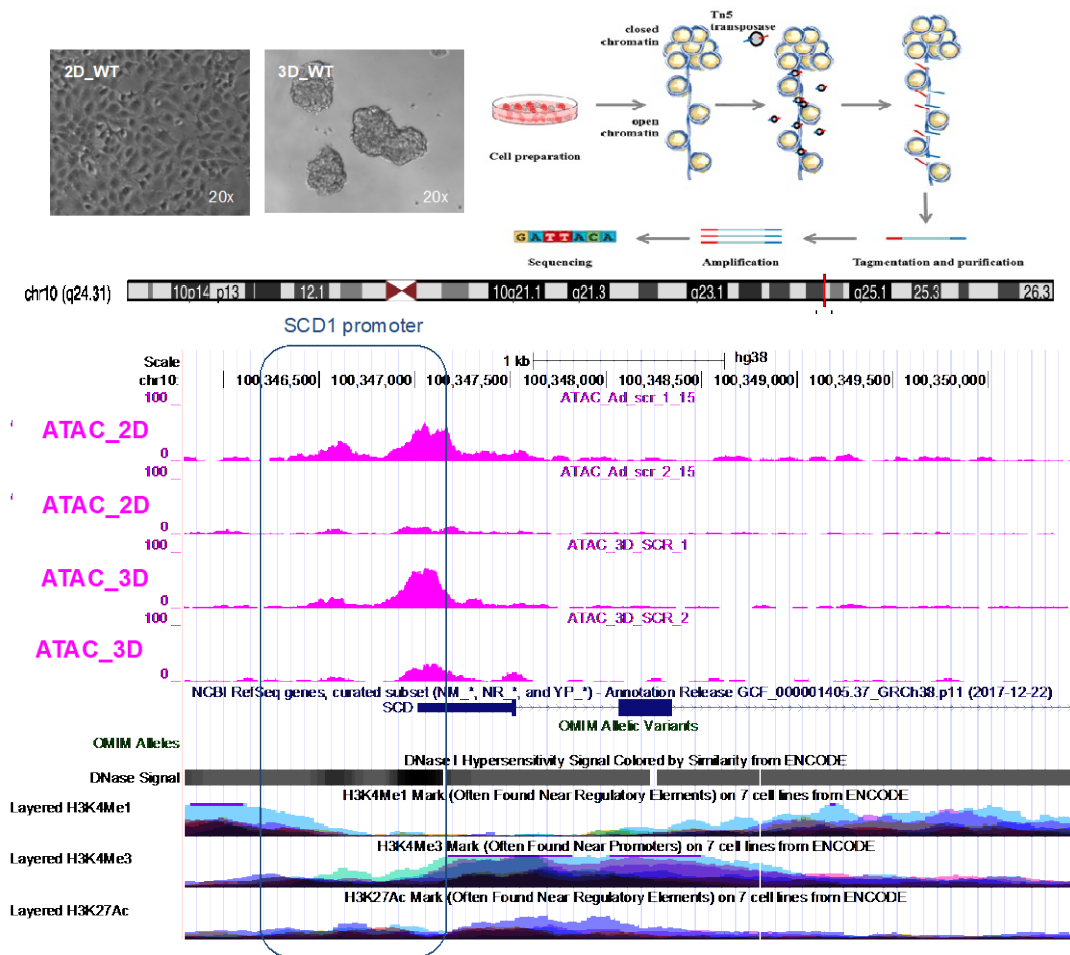


Figura 28. ATAC-seq in cellule 2D e 3D della linea stabile NCI-H460 di adenocarcinoma del polmone. In alto, immagini rappresentative delle cellule NCI-H460 in condizioni di 2D e 3D (20x); figura rappresentativa della ATAC-seq. In basso, immagine estrapolata dal tool *Genome Browser* in cui è stata effettuata l'analisi pipeline per valutare l'apertura e chiusura cromatinica della porzione di promotore di SCD1 (in rosa) in cellule 2D e 3D. l'esperimento è stato eseguito in duplicato biologico.

In linea con i dati di ATAC-seq l'analisi di RNA-seq, effettuata in cellule 2D e 3D, mostra un risultato preliminare piuttosto simile. Nella prima fase dell'analisi bioinformatica sono stati estrapolati circa 15.000 geni espressi in ambedue le condizioni sperimentali. Parallelamente è stata eseguita l'Analisi dei Componenti Principali (PCA) mediante una matrice. Il grafico si costruisce ridefinendo gli assi, utilizzando le Componenti Principali (PC) per rappresentare la natura multivariata dei dati ricavati da esperimenti prodotti in triplicato, in un numero relativamente piccolo di dimensioni. Il grafico sulla PCA dei campioni analizzati mostra un'ottima clusterizzazione nelle condizioni di coltura in 2D e 3D (Figura 29). Per quanto concerne la comparazione effettuata tra cellule in 2D e 3D, una prima analisi di RNA-seq ottenuta mediante "*Differential Expression*" estrae una lista di circa 7000 geni regolati nelle 3D rispetto alle 2D, a voler indicare che si confrontano due tessuti considerevolmente diversi. La vasta quantità di dati da

studiare, elaborare e analizzare, e la validazione dei geni significativamente espressi, richiede del tempo che sarà dedicato nella fase successiva al percorso di Dottorato.

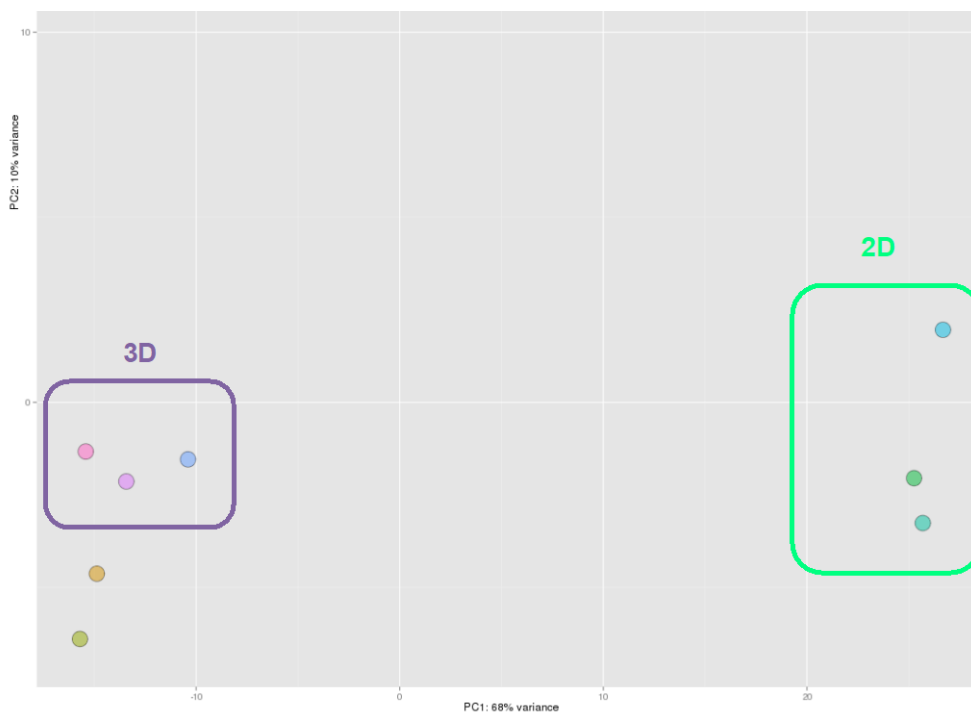


Figura 29. PCA plot. Grafico rappresentativo dell'Analisi delle Componenti Principali (PCA) dei campioni 2D (verde) e 3D (viola). Il grafico presenta sull'asse delle x, PC1 e sull'asse delle y PC2.

## 7 Bibliografia

- Arvanitis, C., & Felsher, D. W. (2006). Conditional transgenic models define how MYC initiates and maintains tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.012>
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., ... Piccolo, S. (2014). YAP/TAZ incorporation in the  $\beta$ -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.013>
- Azzolin, L., Zanconato, F., Bresolin, S., Forcato, M., Basso, G., Bicciato, S., ... Piccolo, S. (2012). Role of TAZ as mediator of wnt signaling. *Cell*.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.027>
- Bailey, T., Krajewski, P., Ladunga, I., Lefebvre, C., Li, Q., Liu, T., ... Zhang, J. (2013). Practical Guidelines for the Comprehensive Analysis of ChIP-seq Data. *PLoS Computational Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003326>
- Baker, R. G., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). NF- $\kappa$ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.12.008>.NF-
- Barr, M. P., Gray, S. G., Hoffmann, A. C., Hilger, R. A., Thomale, J., O'Flaherty, J. D., ... O'Byrne, K. J. (2013). Generation and Characterisation of Cisplatin-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines Displaying a Stem-Like Signature. *PLoS ONE*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054193>
- Barr, M. P., & O'Byrne, K. (2013). *Molecular mechanisms of cisplatin resistance in lung cancer. Lung Cancer: A Comprehensive Overview*.
- Barrangou, R. (2014). Cas9 targeting and the CRISPR revolution. *Science*.  
<https://doi.org/10.1126/science.1252964>
- Barrangou, R., & Horvath, P. (2012). CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. *Annual Review of Food Science and Technology*.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101134>
- Bartucci, M., Dattilo, R., Moriconi, C., Pagliuca, A., Mottolose, M., Federici, G., ... De Maria, R. (2015). TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.5>
- Basak, S. K., Veena, M. S., Oh, S., Huang, G., Srivatsan, E., Huang, M., ... Batra, R. K. (2009). The malignant pleural effusion as a model to investigate intratumoral heterogeneity in lung cancer. *PLoS One*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005884>
- Basile, V., Baruffaldi, F., Dolfini, D., Belluti, S., Benatti, P., Ricci, L., ... Imbriano, C. (2016). NF-YA splice variants have different roles on muscle differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.02.011>
- Basu-Roy, U., Bayin, N. S., Rattanakorn, K., Han, E., Placantonakis, D. G., Mansukhani, A., & Basilico, C. (2015). Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms7411>
- Ben-David, U., Gan, Q.-F., Golan-Lev, T., Arora, P., Yanuka, O., Oren, Y. S., ...

- Benvenisty, N. (2013). Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.015>
- Benatti, P., Chiaramonte, M. L., Lorenzo, M., Hartley, J. A., Hochhauser, D., Gnesutta, N., ... Dolfini, D. (2016). NF-Y activates genes of metabolic pathways altered in cancer cells. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6453>
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., ... Lander, E. S. (2006). A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>
- Bhagat, U., & Das, U. N. (2015). Potential role of dietary lipids in the prophylaxis of some clinical conditions. *Archives of Medical Science : AMS*. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.53302>
- Bhaya, D., Davison, M., & Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annual Review of Genetics*. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>
- Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt520>
- Bjerkvig, R., Tysnes, B. B., Aboody, K. S., Najbauer, J., & Terzis, A. J. A. (2005). Erratum: The origin of the cancer stem cell: Current controversies and new insights (Nature Reviews Cancer (2005) 5 (899-904)). *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1777>
- Blackwood, E. M., & Eisenman, R. N. (1991). Max: A helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.2006410>
- Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.008>
- Briner, A. E., Donohoue, P. D., Gomaa, A. A., Selle, K., Storch, E. M., Nye, C. H., ... Barrangou, R. (2014). Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.019>
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80213-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80213-5)
- Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2688>
- Castro, L. F. C., Wilson, J. M., Gonçalves, O., Galante-Oliveira, S., Rocha, E., & Cunha, I. (2011). The evolutionary history of the stearyl-CoA desaturase gene family in vertebrates. *BMC Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-132>

- Chapman-Rothe, N., Curry, E., Zeller, C., Liber, D., Stronach, E., Gabra, H., ... Brown, R. (2013). Chromatin H3K27me3/H3K4me3 histone marks define gene sets in high-grade serous ovarian cancer that distinguish malignant, tumour-sustaining and chemo-resistant ovarian tumour cells. *Oncogene*.  
<https://doi.org/10.1038/onc.2012.477>
- Chatterjee, S., Szustakowski, J. D., Nanguneri, N. R., Mickanin, C., Labow, M. A., Nohturfft, A., ... Sivasankaran, R. (2009). Identification of novel genes and pathways regulating SREBP transcriptional activity. *PLoS ONE*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005197>
- Chen, S.-F., Lin, Y.-S., Jao, S.-W., Chang, Y.-C., Liu, C.-L., Lin, Y.-J., & Nieh, S. (2013). Pulmonary Adenocarcinoma in Malignant Pleural Effusion Enriches Cancer Stem Cell Properties during Metastatic Cascade. *PLoS ONE*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054659>
- Chu, V. T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K., & Kühn, R. (2015). Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature Biotechnology*.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.3198>
- Ciardiello, C., Roca, M. S., Noto, A., Bruzzese, F., Moccia, T., Vitagliano, C., ... Leone, A. (2016). Synergistic antitumor activity of histone deacetylase inhibitors and anti-ErbB3 antibody in NSCLC primary cultures via modulation of ErbB receptors expression. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7195>
- Clarke, M. F., & Becker, M. W. (2006). Stem Cells: The Real Culprits in Cancer? *Scientific American*. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0708-40sp>
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.2304>
- Collins, L. G., Haines, C., Perkel, R., & Enck, R. E. (2007). Lung cancer: Diagnosis and management. *American Family Physician*. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2345>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Guschin, D. Y. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N. Y.)*. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., ... Piccolo, S. (2011). The hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.048>
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., & Farese, R. V. (2013). Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metabolism*.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>
- DeBose-Boyd, R. A., Brown, M. S., Li, W. P., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., & Espenshade, P. J. (1999). Transport-dependent proteolysis of SREBP: Relocation of Site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81668-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81668-2)
- Dolezal, J. M., Wang, H., Kulkarni, S., Jackson, L., Lu, J., Ranganathan, S., ... Prochownik, E. V. (2017). Sequential adaptive changes in a c-Myc-driven model of hepatocellular carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.782052>

- Dolfini, D., Gatta, R., & Mantovani, R. (2012). NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.628970>
- Dolfini, D., Minuzzo, M., Pavesi, G., & Mantovani, R. (2012). The short isoform of NF-YA belongs to the embryonic stem cell transcription factor circuitry. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.1232>
- Dolfini, D., Zambelli, F., Pedrazzoli, M., Mantovani, R., & Pavesi, G. (2016). A high definition look at the NF-Y regulome reveals genome-wide associations with selected transcription factors. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw096>
- Donnenberg, V. S. V. S., Meyer, E. M. M., & Donnenberg, A. D. A. D. (2009). Measurement of multiple drug resistance transporter activity in putative cancer stem/progenitor cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-280-9\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-280-9_17)
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- El Helou, R., Pinna, G., Cabaud, O., Wicinski, J., Bhajun, R., Guyon, L., ... Ginestier, C. (2017). miR-600 Acts as a Bimodal Switch that Regulates Breast Cancer Stem Cell Fate through WNT Signaling. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.016>
- Eramo, A., Haas, T. L., & De Maria, R. (2010). Lung cancer stem cells: Tools and targets to fight lung cancer. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.207>
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pillozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., ... De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402283>
- Essebiec, A., Lamprecht, M., Piper, M., & Bodén, M. (2017). Bioinformatics approaches to predict target genes from transcription factor binding data. *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.09.001>
- Ferreira, L. M. R. (2010). Cancer metabolism: The Warburg effect today. *Experimental and Molecular Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.08.006>
- Firth, A. L., Menon, T., Parker, G. S., Qualls, S. J., Lewis, B. M., Ke, E., ... Verma, I. M. (2015). Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.062>
- Flavin, R., Peluso, S., Nguyen, P. L., & Loda, M. (2010). Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncology (London, England)*. <https://doi.org/10.2217/fon.10.11>
- Fleming, J. D., Pavesi, G., Benatti, P., Imbriano, C., Mantovani, R., & Struhl, K. (2013). NF-Y coassociates with FOS at promoters, enhancers, repetitive elements, and inactive chromatin regions, and is stereo-positioned with growth-controlling



transcription factors. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.148080.112>

- Flowers, M. T., & Ntambi, J. M. (2008). Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282f9b54d>
- Fritz, V., Benfodda, Z., Rodier, G., Henriquet, C., Iborra, F., Avances, C., ... Fajas, L. (2010). Abrogation of De novo Lipogenesis by Stearoyl-CoA Desaturase 1 Inhibition Interferes with Oncogenic Signaling and Blocks Prostate Cancer Progression in Mice. *Molecular Cancer Therapeutics*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-1064>
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., & Joung, J. K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.2808>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Gatti, G., Maresca, G., Natoli, M., Florenzano, F., Nicolin, A., Felsani, A., & D'Agnano, I. (2009). Myc prevents apoptosis and enhances endoreduplication induced by paclitaxel. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005442>
- Gilbert, L. A., Horlbeck, M. A., Adamson, B., Villalta, J. E., Chen, Y., Whitehead, E. H., ... Weissman, J. S. (2014). Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.029>
- Gilbert, L. a, Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Gloria, A., Torres, S. E., ... Jonathan, S. (2013). CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>. CRISPR-Mediated
- Guo, D., Bell, E. H., Mischel, P., & Chakravarti, A. (2014). Targeting SREBP-1-driven lipid metabolism to treat cancer. *Current Pharmaceutical Design*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/13816128113199990486> LA - English; ABSTRACT LANGUAGE:English
- Gurtner, A., Manni, I., & Piaggio, G. (2017). NF-Y in cancer: Impact on cell transformation of a gene essential for proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.12.005>
- Han, L., Shi, S., Gong, T., Zhang, Z., & Sun, X. (2013). Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.02.006>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harvey, K. F., Zhang, X., & Thomas, D. M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer*. <https://doi.org/nrc3458> [pii]\n10.1038/nrc3458
- Hayashi, H., Higashi, T., Yokoyama, N., Kaida, T., Sakamoto, K., Fukushima, Y., ... Baba, H. (2015). An imbalance in TAZ and YAP expression in hepatocellular carcinoma confers cancer stem cell-like behaviors contributing to disease

- progression. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0291>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes & Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704.bone>
- Heffner, J. E., & Klein, J. S. (2008). Recent advances in the diagnosis and management of malignant pleural effusions. In *Mayo Clinic Proceedings*. <https://doi.org/10.4065/83.2.235>
- Heiden, M. G. Vander, Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Hess, D., Chisholm, J. W., & Igal, R. A. (2010). Inhibition of stearylCoA desaturase activity blocks cell cycle progression and induces programmed cell death in lung cancer cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011394>
- Hockemeyer, D., & Jaenisch, R. (2016). Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.013>
- Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
- Hoffmann, A., Natoli, G., & Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF- $\kappa$ B signaling module. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209933>
- Holder, A. M., Gonzalez-Angulo, A. M., Chen, H., Akcakanat, A., Do, K. A., Fraser Symmans, W., ... Meric-Bernstam, F. (2013). High stearyl-CoA desaturase 1 expression is associated with shorter survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2354-4>
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>
- Hsieh, A. L., Walton, Z. E., Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2015). MYC and metabolism on the path to cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.08.003>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021>
- Hua, X., Wu, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., & Hobbs, H. H. (1995). Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics*. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80009-B](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80009-B)
- Huntly, B. J. P., & Gilliland, D. G. (2005). Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1592>
- Igal, R. A. (2010). Stearyl-coa desaturase-1: A novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq131>

- Igal, R. A. (2016). Stearoyl CoA desaturase-1: New insights into a central regulator of cancer metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.09.009>
- Inoue, T., Kagawa, T., Fukushima, M., Shimizu, T., Yoshinaga, Y., Takada, S., ... Taga, T. (2006). Activation of canonical Wnt pathway promotes proliferation of retinal stem cells derived from adult mouse ciliary margin. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0124>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jacobi, A. M., Rettig, G. R., Turk, R., Collingwood, M. A., Zeiner, S. A., Quadros, R. M., ... Behlke, M. A. (2017). Simplified CRISPR tools for efficient genome editing and streamlined protocols for their delivery into mammalian cells and mouse zygotes. *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.03.021>
- Janda, C. Y., Dang, L. T., You, C., Chang, J., Lau, W. De, Zhong, Z. A., ... Garcia, K. C. (2017). Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and  $\beta$ -catenin signalling. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature22306>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2015). The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Structural Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.002>
- Jiang, P., Mukthavaram, R., Chao, Y., Nomura, N., Bharati, I. S., Fogal, V., ... Kesari, S. (2014). In vitro and in vivo anticancer effects of mevalonate pathway modulation on human cancer cells. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.431>
- Jiang, S., & Mortazavi, A. (2018). Integrating ChIP-seq with other functional genomics data. *Briefings in Functional Genomics*. <https://doi.org/10.1093/bfpg/ely002>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., ... Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>
- Johnson, R., & Halder, G. (2014). The two faces of Hippo: Targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd4161>
- Jordan, C. T., Guzman, M. L., & Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *The New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMra061808>
- Kim, H.-J., Miyazaki, M., & Ntambi, J. M. (2002). Dietary cholesterol opposes PUFA-mediated repression of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by SREBP-1 independent mechanism. *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1194/jlr.M100433-JLR200>
- Kim, Y. C., Gomez, F. E., Fox, B. G., & Ntambi, J. M. (2000). Differential regulation of the stearoyl-CoA desaturase genes by thiazolidinediones in 3T3-L1 adipocytes. *Journal*

*of Lipid Research.*

- Komor, A. C., Badran, A. H., & Liu, D. R. (2017). Review CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell*, 168(1–2), 20–36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.044>
- Komor, A. C., Badran, A. H., Liu, D. R., Guilinger, J. P., Bessen, J. L., Hu, J. H., ... Al., E. (2017). CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.044>
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>
- Lai, D., Ho, K. C., Hao, Y., & Yang, X. (2011). Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2711>
- Le, A., Lane, A. N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., ... Dang, C. V. (2012). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in b cells. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.009>
- Lee, C., & Huang, C.-H. (2013). LASAGNA: A novel algorithm for transcription factor binding site alignment. *BMC Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-108>
- Lee, C., & Huang, C. H. (2014). LASAGNA-Search 2.0: Integrated transcription factor binding site search and visualization in a browser. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu115>
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*.
- Li, C., Yang, W., Zhang, J., Zheng, X., Yao, Y., Tu, K., & Liu, Q. (2014). SREBP-1 has a prognostic role and contributes to invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms15057124>
- Li, H. L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., ... Hotta, A. (2015). Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.10.013>
- Li, J., Condello, S., Thomes-Pepin, J., Ma, X., Xia, Y., Hurley, T. D., ... Cheng, J. X. (2017). Lipid Desaturation Is a Metabolic Marker and Therapeutic Target of Ovarian Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.004>
- Li, Y., Zhang, J., He, J., Zhou, W., Xiang, G., & Xu, R. (2016). MicroRNA-132 cause apoptosis of glioma cells through blockade of the SREBP-1c metabolic pathway related to SIRT1. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.022>
- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., ... Chesnut, J. D. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.024>

- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Lin, Y., Cradick, T. J., Brown, M. T., Deshmukh, H., Ranjan, P., Sarode, N., ... Bao, G. (2014). CRISPR / Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences, *42*(11), 7473–7485. <https://doi.org/10.1093/nar/gku402>
- Liu, Y. P., Yang, C. J., Huang, M. S., Yeh, C. T., Wu, A. T. H., Lee, Y. C., ... Hsiao, M. (2013). Cisplatin selects for multidrug-resistant CD133+ cells in lung adenocarcinoma by activating notch signaling. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1733>
- Lopez-Ayllon, B. D., Moncho-Amor, V., Abarrategi, A., de Cáceres, I. I., Castro-Carpeño, J., Belda-Iniesta, C., ... Sastre, L. (2014). Cancer stem cells and cisplatin-resistant cells isolated from non-small-lung cancer cell lines constitute related cell populations. *Cancer Medicine*. <https://doi.org/10.1002/cam4.291>
- Luo, J.-L., Kamata, H., & Karin, M. (2005). IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI26322>
- Lüscher, B., & Larsson, L. G. (1999). The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: Function and regulation. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202750>
- Ma, W., & Wong, W. H. (2011). The analysis of ChIP-seq data. *Methods in Enzymology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385075-100003-2>
- Maeder, M. L., Linder, S. J., Cascio, V. M., Fu, Y., Ho, Q. H., & Joung, J. K. (2013). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2598>
- Majello, B., & Perini, G. (2014). Myc proteins in cell biology and pathology. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.12.006>
- Mancini, R., Giarnieri, E., de Vitis, C., Malanga, D., Roscilli, G., Noto, A., ... Ciliberto, G. (2011). Spheres derived from lung adenocarcinoma pleural effusions: Molecular characterization and tumor engraftment. *PLoS ONE*, *6*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021320>
- Mancini, R., Noto, A., Pisanu, M. E., De Vitis, C., Maugeri-Saccà, M., & Ciliberto, G. (2018). Metabolic features of cancer stem cells: The emerging role of lipid metabolism. *Oncogene*, *37*(18), 2367–2378. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0141-3>
- Mansara, P. P., Deshpande, R. A., Vaidya, M. M., & Kaul-Ghanekar, R. (2015). Differential ratios of omega fatty acids (AA/EPA+DHA) modulate growth, lipid peroxidation and expression of tumor regulatory MARBPs in breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136542>
- Mantovani, R. (1998). A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/26.5.1135>
- Martin, C., & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation

- C., & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6, 838–849. doi:10.1038/nrm1761. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm1761>
- Marusyk, A., Almendro, V., & Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: A looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc3261>
- Maruyama, T., Dougan, S. K., Truttmann, M. C., Bilate, A. M., Ingram, J. R., & Ploegh, H. L. (2015). Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.3190>
- Mason, P., Liang, B., Li, L., Fremgen, T., Murphy, E., Quinn, A., ... Carter, K. (2012). SCD1 inhibition causes cancer cell death by depleting mono-unsaturated fatty acids. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033823>
- Maugeri-Saccà, M., Bartucci, M., & De Maria, R. (2012). DNA damage repair pathways in cancer stem cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-1040>
- Mauvoisin, D., Charfi, C., Lounis, A. M., Rassart, E., & Mounier, C. (2013). Decreasing stearyl-CoA desaturase-1 expression inhibits  $\beta$ -catenin signaling in breast cancer cells. *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/cas.12032>
- Meacham, C. E., & Morrison, S. J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature12624>
- Medema, J. P. (2013). Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb2717>
- Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc2222>
- Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., ... Bernstein, B. E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06008>
- Miyaoka, Y., Berman, J. R., Cooper, S. B., Mayerl, S. J., Chan, A. H., Zhang, B., ... Conklin, B. R. (2016). Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep23549>
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W. C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H. J., & Ntambi, J. M. (2004). Stearyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402781200>
- Miyazaki, M., Flowers, M. T., Sampath, H., Chu, K., Otselberger, C., Liu, X., & Ntambi, J. M. (2007). Hepatic Stearyl-CoA Desaturase-1 Deficiency Protects Mice from Carbohydrate-Induced Adiposity and Hepatic Steatosis. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.014>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic

- elements. *Journal of Molecular Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
- Mojica, F. J. M., & Montoliu, L. (2016). On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.005>
- Moon, Y. A., Liang, G., Xie, X., Frank-Kamenetsky, M., Fitzgerald, K., Koteliansky, V., ... Horton, J. D. (2012). The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.017>
- Moroishi, T., Hansen, C. G., & Guan, K. L. (2015). The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc3876>
- Nardone, V., Chaves-Sanjuan, A., & Nardini, M. (2017). Structural determinants for NF-Y/DNA interaction at the CCAAT box. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.09.006>
- Ngollo, M., Lebert, A., Daures, M., Judes, G., Rifai, K., Dubois, L., ... Bernard-Gallon, D. (2017). Global analysis of H3K27me3 as an epigenetic marker in prostate cancer progression. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3256-y>
- Nie, L. Y., Lu, Q. T., Li, W. H., Yang, N., Dongol, S., Zhang, X., & Jiang, J. (2013). Sterol regulatory element-binding protein 1 is required for ovarian tumor growth. *Oncol Rep*. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2575>
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., ... Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Niu, X., He, W., Song, B., Ou, Z., Fan, D., Chen, Y., ... Third, T. (2016). Combining single-strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in Beta-thalassemia-induced Pluripotent Stem Cells. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.719237>
- Nohturfft, A., DeBose-Boyd, R. A., Scheek, S., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1999). Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11235>
- Noto, A., De Vitis, C., Pisanu, M. E., Roscilli, G., Ricci, G., Catizone, A., ... Mancini, R. (2017). Stearoyl-CoA-desaturase 1 regulates lung cancer stemness via stabilization and nuclear localization of YAP/TAZ. *Oncogene*, 36(32), 4573–4584. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.75>
- Noto, A., Raffa, S., De Vitis, C., Roscilli, G., Malpicci, D., Coluccia, P., ... Mancini, R. (2013). Stearoyl-CoA desaturase-1 is a key factor for lung cancer-initiating cells. *Cell Death and Disease*, 4(12), e947-11. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.444>
- Ntambi, J. M. (1999). Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty

acids and cholesterol. *Journal of Lipid Research*.

- Ntambi, J. M., & Miyazaki, M. (2004). Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Progress in Lipid Research*. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00039-0)
- O'Brien, C. A., Kreso, A., & Jamieson, C. H. M. (2010). Cancer stem cells and self-renewal. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2824>
- Ohm, J. E., McGarvey, K. M., Yu, X., Cheng, L., Schuebel, K. E., Cope, L., ... Baylin, S. B. (2007). A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1972>
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011>
- Park, C. Y., Kim, D. H., Son, J. S., Sung, J. J., Lee, J., Bae, S., ... Kim, J. S. (2015). Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.001>
- Pasini, A., Paganelli, G., Tesei, A., Zoli, W., Giordano, E., & Calistri, D. (2012). Specific Biomarkers Are Associated with Docetaxel and Gemcitabine-Resistant NSCLC Cell Lines. *Translational Oncology*. <https://doi.org/10.1593/tlo.12256>
- Paton, C. M., & Ntambi, J. M. (2010). Loss of stearoyl-CoA desaturase activity leads to free cholesterol synthesis through increased Xbp-1 splicing. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00388.2010>
- Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2014). Tackling the cancer stem cells — what challenges do they pose? *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd4253>
- Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P., Ma, E., Doudna, J. A., & Liu, D. R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.2673>
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Phoebe, Y. (n.d.). Farnham Lab Protocol for CRISPR / Cas 9- - mediated enhancer deletion using a puromycin selection vector, 1–5.
- Piccolo, S., Cordenonsi, M., & Dupont, S. (2013). Molecular pathways: YAP and TAZ take center stage in organ growth and tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3172>
- Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014). The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014>
- Pike, L. J. (2009). The challenge of lipid rafts. *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800040-JLR200>



- Pike, L. J., Han, X., & Gross, R. W. (2005). Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: A shotgun lipidomics study. *Journal of Biological Chemistry*.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M503805200>
- Pisanu, M. E., Noto, A., De Vitis, C., Masiello, M. G., Coluccia, P., Proietti, S., ... Mancini, R. (2014). Lung Cancer Stem Cell Lose Their Stemness Default State after Exposure to Microgravity. *BioMed Research International*, 2014.  
<https://doi.org/10.1155/2014/470253>
- Pisanu, M. E., Noto, A., De Vitis, C., Morrone, S., Scognamiglio, G., Botti, G., ... Mancini, R. (2017). Blockade of Stearoyl-CoA-desaturase 1 activity reverts resistance to cisplatin in lung cancer stem cells. *Cancer Letters*, 406, 93–104.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.07.027>
- Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z. (2015). The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.015>
- Polager, S., & Ginsberg, D. (2008). NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.08.003>
- Prieto-Vila, M., Takahashi, R. U., Usuba, W., Kohama, I., & Ochiya, T. (2017). Drug resistance driven by cancer stem cells and their niche. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18122574>
- Ralston, J. C., Matravadia, S., Gaudio, N., Holloway, G. P., & Mutch, D. M. (2015). Polyunsaturated fatty acid regulation of adipocyte FADS1 and FADS2 expression and function. *Obesity*. <https://doi.org/10.1002/oby.21035>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., ... Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
- Ran, F. A., Hsu, P. D. P., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Ricci, A., De Vitis, C., Noto, A., Fattore, L., Mariotta, S., Cherubini, E., ... Mancini, R. (2013). TrkB is responsible for EMT transition in malignant pleural effusions derived cultures from adenocarcinoma of the lung. *Cell Cycle*.  
<https://doi.org/10.4161/cc.24759>
- Rios-Esteves, J., Haugen, B., & Resh, M. D. (2014). Identification of key residues and regions important for porcupine-mediated Wnt acylation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.561209>
- Rios-Esteves, J., & Resh, M. D. (2013). Stearoyl CoA Desaturase Is Required to Produce Active, Lipid-Modified Wnt Proteins. *Cell Reports*.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.027>
- Röhrig, F., & Schulze, A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer.

- Nature Reviews Cancer*, 16(11), 732–749. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.89>
- Rojo, F. P., Karl, R., Nyman, M., Theodore, A. A., Navarro, M. P., Ryan, M. H., ... Theodore, A. A. (2018). CRISPR-Cas systems : ushering in the new genome editing era. *Bioengineered*, 9(1), 214–221. <https://doi.org/10.1080/21655979.2018.1470720>
- Roongta, U. V, Pabalan, J. G., Wang, X., Ryseck, R.-P., Fagnoli, J., Henley, B. J., ... Rupnow, B. a. (2011). Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates stearyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy. *Molecular Cancer Research : MCR*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0126>
- Roscilli, G., De Vitis, C., Ferrara, F. F. F. F., Noto, A., Cherubini, E., Ricci, A., ... Mancini, R. (2016). Human lung adenocarcinoma cell cultures derived from malignant pleural effusions as model system to predict patients chemosensitivity. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0816-x>
- Rosenbluh, J., Nijhawan, D., Cox, A. G., Li, X., Neal, J. T., Schafer, E. J., ... Hahn, W. C. (2012).  $\beta$ -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.026>
- Ryan, K. M., Ernst, M. K., Rice, N. R., & Vousden, K. H. (2000). Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35009130>
- Scaglia, N., & Igal, R. A. (2005). Stearyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells. *The Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501159200>
- Shah, S. A., Erdmann, S., Mojica, F. J. M., & Garrett, R. A. (2013). Protospacer recognition motifs: Mixed identities and functional diversity. *RNA Biology*. <https://doi.org/10.4161/rna.23764>
- Shen, Y., Yue, F., Mc Cleary, D. F., Ye, Z., Edsall, L., Kuan, S., ... Lobanenkov, V. V. (2012). A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11243>
- Shiina, M., & Bourguignon, L. Y. W. (2015). Selective Activation of Cancer Stem Cells by Size-Specific Hyaluronan in Head and Neck Cancer. *International Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1155/2015/989070>
- Shimano, H. (2001). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): Transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Progress in Lipid Research*. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00010-8)
- Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R. E., Herz, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., & Horton, J. D. (1997). Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI119746>
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J. D., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1999). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13656>
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., ... Koonin, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews*

*Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>

- Song, S., Ajani, J. A., Honjo, S., Maru, D. M., Chen, Q., Scott, A. W., ... Johnson, R. L. (2014). Hippo coactivator YAP1 upregulates SOX9 and endows esophageal Cancer cells with stem-like properties. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3569>
- Sorrentino, G., Ruggeri, N., Specchia, V., Cordenonsi, M., Mano, M., Dupont, S., ... Del Sal, G. (2014). Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb2936>
- Soufi, A., Garcia, M. F., Jaroszewicz, A., Osman, N., Pellegrini, M., & Zaret, K. S. (2015). Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.017>
- Tabor, D. E., Kim, J. B., Spiegelman, B. M., & Edwards, P. A. (1999). Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20603>
- Thurman, R. E., Rynes, E., Humbert, R., Vierstra, J., Maurano, M. T., Haugen, E., ... Stamatoyannopoulos, J. A. (2012). The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11232>
- Tirinato, L., Liberale, C., Di Franco, S., Candeloro, P., Benfante, A., La Rocca, R., ... Di Fabrizio, E. (2015). Lipid droplets: A new player in colorectal cancer stem cells unveiled by spectroscopic imaging. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.1837>
- Torre, L., Bray, F., Siegel, R., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- Trop-Steinberg, S., & Azar, Y. (2018). Is Myc an Important Biomarker? Myc Expression in Immune Disorders and Cancer. *American Journal of the Medical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.06.007>
- Vastenhouw, N. L., Zhang, Y., Woods, I. G., Imam, F., Regev, A., Liu, X. S., ... Schier, A. F. (2010). Chromatin signature of embryonic pluripotency is established during genome activation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08866>
- Vinogradov, S., & Wei, X. (2012). Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (London, England)*. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.22.Cancer>
- Von Roemeling, C. A., Marlow, L. A., Pinkerton, A. B., Crist, A., Miller, J., Tun, H. W., ... Copland, J. A. (2015). Aberrant lipid metabolism in anaplastic thyroid carcinoma reveals stearoyl CoA desaturase 1 as a novel therapeutic target. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2764>
- Von Roemeling, C. A., Marlow, L. A., Wei, J. J., Cooper, S. J., Caulfield, T. R., Wu, K., ... Copland, J. A. (2013). Stearoyl-CoA desaturase 1 is a novel molecular therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3249>
- Wang, C. W. (2016). Lipid droplets, lipophagy, and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*.

<https://doi.org/10.1016/j.bbali.2015.12.010>

- Wang, J., Wang, H., Li, Z., Wu, Q., Lathia, J. D., McLendon, R. E., ... Rich, J. N. (2008). c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003769>
- Wang, J., Wang, L., Ho, C. T., Zhang, K., Liu, Q., & Zhao, H. (2017). Garcinol from *Garcinia indica* Downregulates Cancer Stem-like Cell Biomarker ALDH1A1 in Nonsmall Cell Lung Cancer A549 Cells through DDIT3 Activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00346>
- Wang, Y., Dong, Q., Zhang, Q., Li, Z., Wang, E., & Qiu, X. (2010). Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer. *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01511.x>
- Williams, K. J., Argus, J. P., Zhu, Y., Wilks, M. Q., Marbois, B. N., York, A. G., ... Bensinger, S. J. (2013). An essential requirement for the SCAP/SREBP signaling axis to protect cancer cells from lipotoxicity. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0382-T>
- Wortman, P., Miyazaki, Y., Kalupahana, N. S., Kim, S., Hansen-Petrik, M., Saxton, A. M., ... Moustaid-Moussa, N. (2009). n3 and n6 polyunsaturated fatty acids differentially modulate prostaglandin E secretion but not markers of lipogenesis in adipocytes. *Nutrition and Metabolism*. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-5>
- Wu, C.-H., van Riggelen, J., Yetil, A., Fan, A. C., Bachireddy, P., & Felsher, D. W. (2007). Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701953104>
- Wu, X., Zou, X., Chang, Q., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, L., ... Liang, B. (2013). The evolutionary pattern and the regulation of stearoyl-coa desaturase genes. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/856521>
- Wu, Y., Chen, K., Liu, X., Huang, L., Zhao, D., Li, L., ... Liu, X. (2016). Srebp-1 Interacts with c-Myc to Enhance Somatic Cell Reprogramming. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.2209>
- Xie, M., Zhang, L., He, C.-S., Hou, J.-H., Lin, S.-X., Hu, Z.-H., ... Zhao, H.-Y. (2012). Prognostic significance of TAZ expression in resected non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318248240b>
- Ye, J., & DeBose-Boyd, R. A. (2011). Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004754>
- Yeung, B., Yu, J., & Yang, X. (2016). Roles of the Hippo pathway in lung development and tumorigenesis. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.29457>
- Zaidi, S. K., Frieze, S. E., Gordon, J. A., Heath, J. L., Messier, T., Hong, D., ... Stein, G. S. (2017). Bivalent Epigenetic Control of Oncofetal Gene Expression in Cancer. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.00352-17>
- Zalatan, J. G., Lee, M. E., Almeida, R., Gilbert, L. A., Whitehead, E. H., La Russa, M., ...

- Lim, W. A. (2015). Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.052>
- Zambelli, F., & Pavesi, G. (2017). Genome wide features, distribution and correlations of NF-Y binding sites. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.10.007>
- Zanconato, F., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.005>
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., ... Zhang, F. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
- Zhang, J., Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2017). Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/emj.201696151>
- Zhang, Y., Heidrich, N., Ampattu, B. J., Gunderson, C. W., Seifert, H. S., Schoen, C., ... Sontheimer, E. J. (2013). Processing-Independent CRISPR RNAs Limit Natural Transformation in *Neisseria meningitidis*. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.001>
- Zhang, Y., Schmid, B., Nielsen, T. T., Nielsen, J. E., Clausen, C., Hyttel, P., ... Freude, K. K. (2016). Generation of a human induced pluripotent stem cell line via CRISPR-Cas9 mediated integration of a site-specific heterozygous mutation in CHMP2B. *Stem Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.06.004>
- Zuris, J. A., Thompson, D. B., Shu, Y., Guilinger, J. P., Bessen, J. L., Hu, J. H., ... Liu, D. R. (2015). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.3081>

## 8 Elenco Pubblicazioni

1. "MicroRNA-551b expression profile in low and high-grade cervical intraepithelial neoplasia". Lukic A, Di Properzio M, Carico E, **De Vitis C**, Giglio S, Bordi G, Caserta D, Mancini R. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Jul;22(14):4448-4457. doi: 10.26355/eurrev\_201807\_15496.
2. "Metabolic features of cancer stem cells: the emerging role of lipid metabolism". Mancini R, Noto A, Pisanu ME, **De Vitis C**, Maugeri-Saccà M, Ciliberto G. *Oncogene*. 2018 May;37(18):2367-2378. doi: 10.1038/s41388-018-0141-3. Epub 2018 Feb 15. Review.
3. "Blockade of Stearoyl-CoA-desaturase 1 activity reverts resistance to cisplatin in lung cancer stem cells". Pisanu ME, Noto A, **De Vitis C**, Morrone S, Scognamiglio G, Botti G, Venuta F, Diso D, Jakopin Z, Padula F, Ricci A, Mariotta S, Giovagnoli MR, Giarnieri E, Amelio I, Agostini M, Melino G, Ciliberto G, Mancini R. *Cancer Lett*. 2017 Oct 10;406:93-104. doi: 10.1016/j.canlet.2017.07.027. Epub 2017 Aug 7
4. "Stearoyl-CoA-desaturase 1 regulates lung cancer stemness via stabilization and nuclear localization of YAP/TAZ". Noto A, **De Vitis C**, Pisanu ME, Roscilli G, Ricci G, Catizone A, Sorrentino G, Chianese G, Taglialatela-Scafati O, Trisciuglio D, Del Bufalo D, Di Martile M, Di Napoli A, Ruco L, Costantini S, Jakopin Z, Budillon A, Melino G, Del Sal G, Ciliberto G, Mancini R. *Oncogene*. 2017 Aug 10;36(32):4671-4672. doi: 10.1038/onc.2017.212. Epub 2017 Jun 19.
5. "Human lung adenocarcinoma cell cultures derived from malignant pleural effusions as model system to predict patients chemosensitivity". Roscilli G, **De Vitis C**, Ferrara FF, Noto A, Cherubini E, Ricci A, Mariotta S, Giarnieri E, Giovagnoli MR, Torrisi MR, Bergantino F, Costantini S, Fenizia F, Lambiase M, Aurisicchio L, Normanno N, Ciliberto G, Mancini R. *J Transl Med*. 2016 Feb 29;14:61. doi: 10.1186/s12967-016-0816-x.
6. "The Akt1/IL-6/STAT3 pathway regulates growth of lung tumor initiating cells". Malanga D, De Marco C, Guerriero I, Colelli F, Rinaldo N, Scrima M, Mirante T, **De Vitis C**, Zoppoli P, Ceccarelli M, Riccardi M, Ravo M, Weisz A, Federico A, Franco R, Rocco G, Mancini R, Rizzuto A, Gulletta E, Ciliberto G, Viglietto G. *Oncotarget*. 2015 Dec 15;6(40):42667-86. doi: 10.18632/oncotarget.5626.

## **9 Ringraziamenti**