



Università degli studi di Palermo

Dottorato di Ricerca in Oncobiologia Sperimentale

**IN CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO MG-63,
IL TRATTAMENTO CON 3-AMINOBENZAMIDE
FAVORISCE L'ESPANSIONE DI UNA
POPOLAZIONE CELLULARE "STEM-LIKE"
(SSD Bio/10)**

**Tesi di Dottorato di:
Dott. Riccardo Di Fiore**

**Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa Renza Vento**

**Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Giovanni Tesoriere**

**TRIENNIO 2006-2008
CICLO XX**

INTRODUZIONE

CELLULE STAMINALI TUMORALI

La parola “staminale” in greco significa “trave, puntello”. Il vocabolo è stato utilizzato da biologi e medici per esprimere le proprietà di una cellula indifferenziata progenitrice di tutte le cellule. Le cellule staminali infatti possiedono due importanti caratteristiche che le distinguono dagli altri tipi cellulari essendo cellule capaci sia di replicarsi (self-renewal) per lunghi periodi, che di dare origine a progenitori (transit amplifying cells) in grado di differenziare in uno o più tipi cellulari maturi diversi. Pertanto, una delle caratteristiche fondamentali delle cellule staminali è il fatto di non possedere proprietà strutturali e funzionali tipiche delle cellule di un dato tessuto, ma di dare origine a cellule capaci di differenziare nei tipi cellulari specifici del tessuto in cui risiedono o di un altro tessuto (Alison et al., 2002; Mayhall et al., 2004; Krtoliuca, 2005).

Le cellule staminali possono essere classificate sia in base alla loro origine anatomica che alla capacità di differenziare. A seconda del tessuto dal quale vengono isolate le cellule staminali vengono distinte in cellule staminali embrionali, cellule staminali fetali e cellule staminali adulte, mentre in base alla loro capacità di differenziare le cellule staminali possono essere suddivise in cellule totipotenti, pluripotenti, multipotenti ed unipotenti. Le **totipotenti** sono cellule, allo stadio di pre-blastocisti dello sviluppo embrionale, che sono in grado di dare origine a tutte le cellule completamente differenziate del corpo ed alle cellule del trofoblasto. Le cellule staminali **pluripotenti** si trovano nell’embrione allo stadio di blastocisti e possono differenziare in quasi tutte le cellule che originano dai tre foglietti embrionali, ma non sono in grado di dare origine alla placenta ed alle strutture di supporto. Le cellule staminali **multipotenti** possono dare origine ad un numero finito di linee cellulari differenziate e sono solitamente isolate dai tessuti adulti. Infine, le cellule staminali con la capacità di differenziare in un unico tipo di cellule specializzate sono chiamate **unipotenti** (fig. 1) (Robert, 2004).

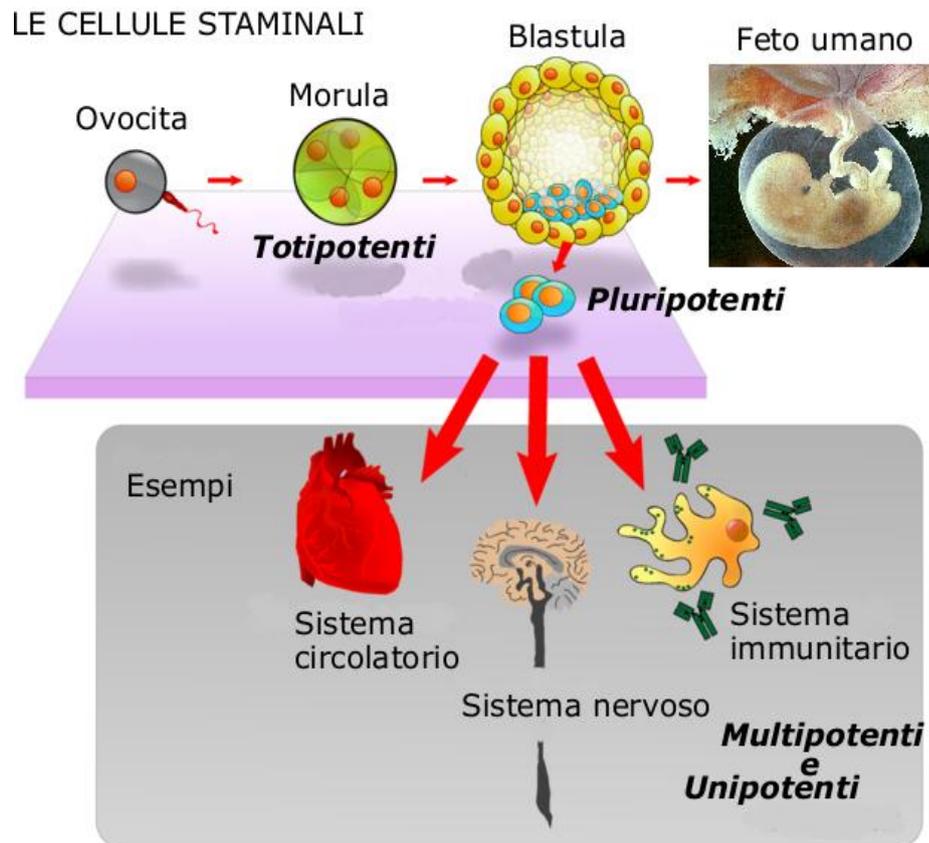


Fig.1 - Classificazione delle cellule staminali in base alla loro capacità di differenziare (totipotenti, pluripotenti, multipotenti, unipotenti). (www.iapb.it/images/staminali-totipotenti (google)).

Le **cellule staminali embrionali** derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti. Queste cellule sono pluripotenti, cioè in grado di differenziare in tutti i tipi cellulari derivati dai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma). Le **cellule staminali fetali**, si ricavano dai feti abortiti, e possono essere isolate dal midollo osseo, dal sangue fetale o da altri tessuti fetali, quali fegato e reni. All'interno della classe delle cellule staminali fetali si possono quindi distinguere le cellule staminali emopoietiche, le cellule staminali mesenchimali, le cellule staminali endoteliali, le cellule staminali epiteliali e le cellule staminali neurali. Le **cellule staminali adulte** sono cellule indifferenziate che si trovano tra le cellule differenziate all'interno di un tessuto o di un organo. Il ruolo principale di queste cellule è quello di mantenere l'omeostasi e riparare il tessuto in cui si trovano. A differenza delle cellule staminali embrionali che esistono per un tempo limitato durante l'embriogenesi, le

cellule staminali adulte persistono per tutta la vita dell'organismo. L'ipotesi che le cellule staminali adulte potessero produrre solamente specifiche linee cellulari, appartenenti al tessuto in cui queste cellule risiedevano, è stata smentita da diversi studi che hanno dimostrato come queste cellule possono essere progenitori anche di cellule tipiche di altri tessuti. Tali cellule sono state individuate in diversi apparati, tra i quali la pelle, il muscolo scheletrico, il fegato, il cervello, il midollo osseo ed il sangue periferico. In particolare, nel midollo osseo e nel sangue periferico sono state identificate cellule staminali emopoietiche, precursori endoteliali e cellule staminali mesenchimali (Collins et al., 2005; Shinya, 2007).

Il mantenimento della linea staminale è condizionato da precisi segnali derivati dal microambiente in cui la cellula risiede e si realizza attraverso due meccanismi. Il primo meccanismo, proprio delle cellule staminali embrionali, si basa sulla divisione simmetrica in cui si generano due cellule figlie staminali (fig. 2A). Il secondo si basa su una divisione asimmetrica, propria delle cellule staminali adulte. Da tale divisione, ad ogni ciclo cellulare, si generano una cellula identica alla cellula madre ed una più differenziata capace di un numero limitato di cicli prima di dare origine a cellule mature del tessuto (fig. 2B) (Molofsky et al., 2004; Clevers, 2005).

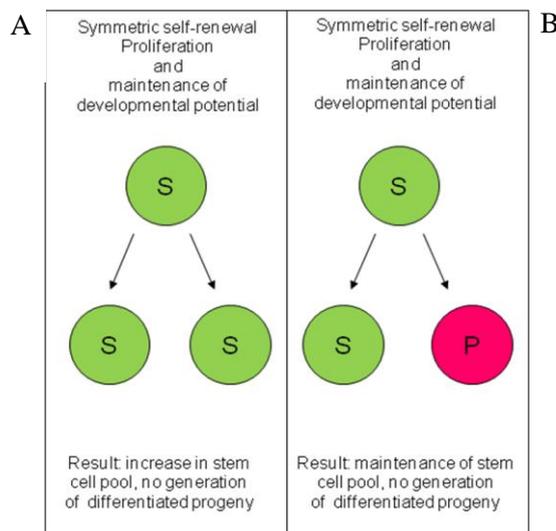


Fig. 2 – A) Meccanismo di divisione simmetrica, caratteristica delle cellule staminali embrionali in cui si generano due cellule figlie staminali. B) Meccanismo di divisione asimmetrica, caratteristica delle cellule staminali adulte in cui si generano una cellula identica alla cellula madre ed una più differenziata. (Curr Opin Cell Biol 2004).

Gli studiosi hanno appena iniziato a comprendere i segnali interni ed esterni che controllano la capacità di autorigenerarsi e di differenziarsi delle cellule staminali. I segnali interni sono controllati da geni che contengono istruzioni per tutte le funzioni e le strutture di una data cellula, mentre i segnali esterni includono sia fattori di crescita o citochine prodotte da altre cellule, sia segnali specifici dal microambiente dove queste cellule risiedono. Diversi studi, infatti, suggeriscono che le cellule staminali adulte risiedono in specifici microambienti, o nicchie, che controllano la capacità di autorigenerarsi e di differenziarsi di tali cellule. Le nicchie delle cellule staminali presentano le seguenti funzioni e caratteristiche:

- sono composte da un gruppo di cellule site in una specifica zona, che operano per mantenere le cellule staminali;
- rappresentano il sito di ancoraggio per le cellule staminali, in cui le molecole di adesione sono coinvolte nelle interazioni delle cellule staminali con la nicchia e con la matrice extracellulare;
- producono fattori estrinseci (Hedgehog, Wnt, Notch, BMP, FGF) che controllano il numero, la proliferazione e il progressivo differenziamento cellulare;
- controllano il meccanismo di divisione asimmetrica delle cellule staminali adulte.

Le cellule staminali adulte risiedono in queste aree, specifiche per ciascun tessuto, dove rimangono quiescenti per molti anni finché vengono attivate da un segnale o in seguito a qualche danno subito dal tessuto. L'alterazione dell'equilibrio tra segnali proliferativi ed antiproliferativi induce le cellule staminali ad una proliferazione incontrollata e probabilmente alla tumorigenesi (fig. 3) (Li and Xie, 2005; Spradling , 2001; Li and Neaves, 2006).

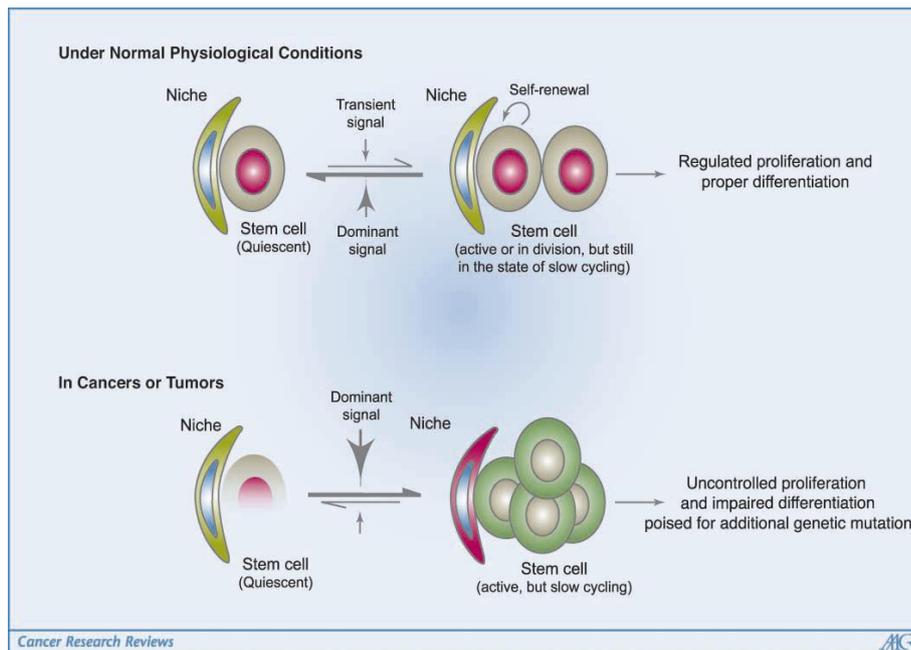


Fig. 3 - Confronto tra la condizione fisiologica normale, in cui la cellula staminale risiede in uno stato quiescente nella propria nicchia, finché viene attivata da un segnale o in seguito a qualche danno subito dal tessuto e la condizione patologica, in cui la cellula si trova in una condizione alterata dove verrà attivata una proliferazione incontrollata. (Cancer Res 2006).

Numerose prove sperimentali suggeriscono che questo serbatoio di cellule perenni destinate a dividersi periodicamente durante la nostra esistenza costituisca terreno fertile per la trasformazione tumorale: infatti, per diventare cancerosa la cellula deve accumulare mutazioni successive e quindi andare incontro a numerosi cicli di duplicazioni del DNA; deve inoltre contare su un'immortalità replicativa che è caratteristica delle cellule staminali ma non delle cellule differenziate. Pertanto, oggi si ritiene che la trasformazione tumorale possa avere origine da una cellula staminale alterata, la cosiddetta “**cellula staminale cancerosa**” che, come la cellula staminale, presenta le seguenti caratteristiche: capacità di autorigenerarsi, elevata capacità migratoria, elevato potenziale proliferativo e resistenza alle droghe (Graziano et al., 2008; Crowe et al., 2004; Dalerba et al., 2007). Per spiegare come possa avere origine la cellula staminale cancerosa sono stati proposti diversi modelli, ma quelli che sono più supportati da dati sperimentali sono tre: il primo, prevede che tale cellula abbia origine da una cellula staminale normale trasformata (fig. 4A), che darà origine all'intera popolazione cellulare eterogenea che costituisce la massa tumorale; il secondo, prevede una mutazione oncogenica a carico di una cellula progenitrice (fig. 4B), per cui questa

riattiva le vie di segnalazione che regolano la capacità di autorigenazione tipica delle cellule staminali (Al-Hajj and Clarke, 2004).

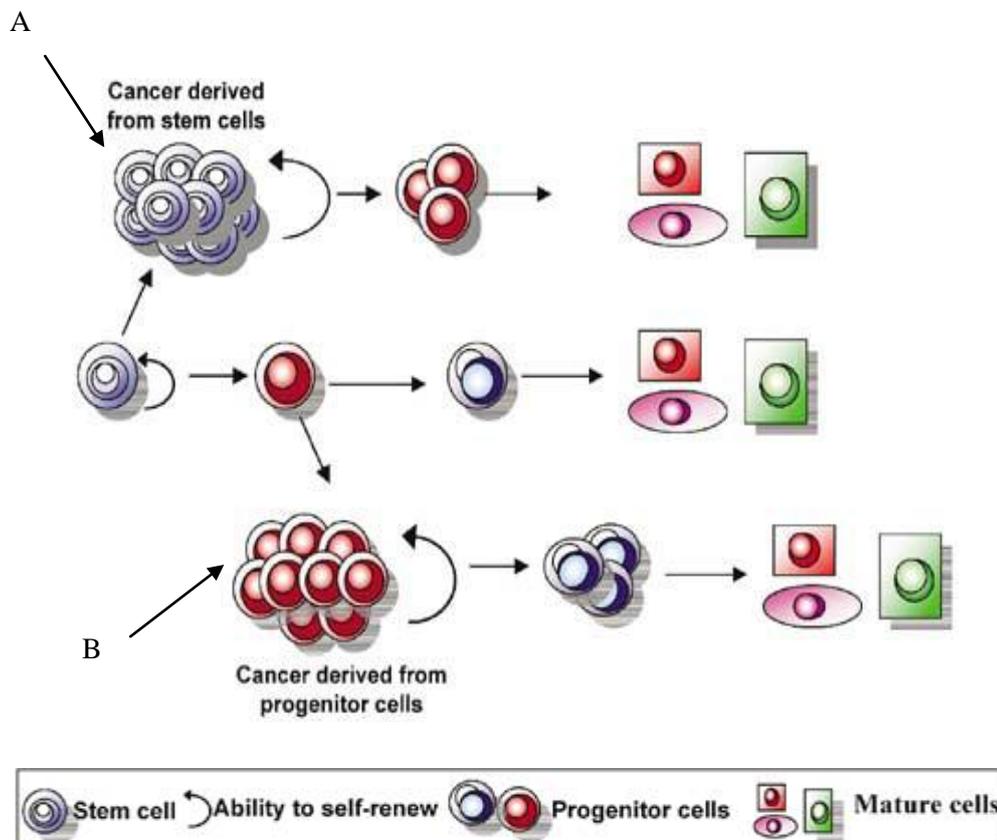


Fig. 4 – A) La cellula staminale cancerosa può avere origine da una cellula staminale normale trasformata che darà origine all'intera popolazione cellulare eterogenea che costituisce la massa tumorale. B) La cellula staminale può avere origine da una mutazione oncogenica a carico di una cellula progenitrice, per cui questa riattiva le vie di segnalazione che regolano la capacità di autorigenazione tipica delle cellule staminali. (Oncogene 2004).

Il terzo modello tiene conto del processo di fusione cellulare, caratteristico di cellule immature come le cellule staminali e tumorali il cui genoma è molto instabile, che conduce alla transdifferenziazione (Bjerkvig et al., 2005). Negli eucarioti la fusione cellulare è un processo fisiologico, finemente regolato durante lo sviluppo e il differenziamento. L'importanza di tale processo durante lo sviluppo e nelle patologie è messa in rilievo in numerosi processi biologici: nella fecondazione la fusione cellula uovo e spermatozoo; nello sviluppo muscolare la fusione dei mioblasti mononucleati per la formazione delle fibre muscolari multinucleate; nei processi di formazione ossea la fusione dei macrofagi nella formazione degli osteoclasti; a livello placentare la fusione

tra trofoblasti e sincizio trofoblasti (He et al., 2005). Difetti nei meccanismi che regolano tale processo danno origine a patologie quali malattie muscolari, osteopetrosi, difetti nella fusione oocita/spermatozoo, e probabilmente, possono portare alla fusione tra una cellula staminale ed una trasformata, un fenomeno di frequente riscontro in corso di trasformazione neoplastica. Houghton et al. (2004) hanno descritto la migrazione selettiva di staminali ematopoietiche nell'epitelio gastrico in corso di infezione da *Helicobacter felix*, osservando come la capacità di dare origine a carcinoma gastrico fosse ristretta a tali popolazioni cellulari di derivazione midollari. Tali osservazioni indicano il possibile verificarsi di fenomeni di transdifferenziazione causati dalla fusione tra una cellula staminale migrata (dal midollo osseo) con una cellula differenziata in cui si sono verificate mutazioni potenzialmente cancerogene. Comunque, non è ancora chiaro se una cellula staminale tumorale possa derivare da una staminale tissutale trasformata o da una cellula matura dedifferenziata, dove la possibilità della transdifferenziazione possa essere attribuita a fenomeni di trasferimento genomico orizzontale (fig. 5) (Wicha et al., 2006; Christel et al., 2005).

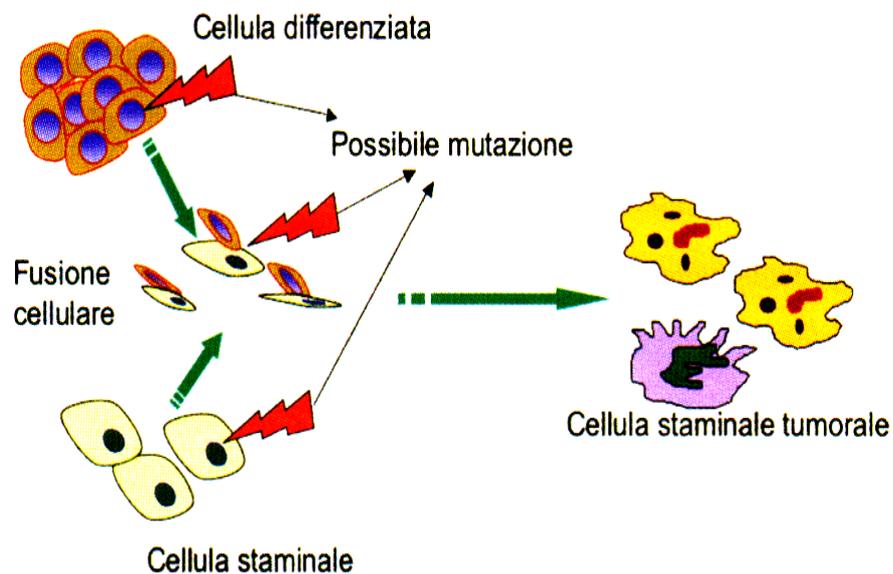


Fig. 5 - Secondo questo modello la cellula staminale cancerosa può avere origine da un processo di fusione cellulare tra una cellula staminale e una cellula differenziata in cui si sono verificate mutazioni potenzialmente cancerogene (transdifferenziazione). (J Exp Ther Oncol 2005).

E' circa un decennio che il significato e soprattutto l'esistenza di cellule staminali tumorali è oggetto di discussione. Numerosi studi dimostrano l'esistenza ed il ruolo che tali cellule svolgono nello sviluppo e nel mantenimento del tumore. E' noto che i tumori solidi sono costituiti da popolazioni cellulari eterogenee, nel cui ambito è stata evidenziata la presenza di cellule con caratteristiche simili a quelle staminali (Reya et al., 2001). Pertanto, il tumore può essere visto come un vero e proprio organo e le diverse cellule che lo costituiscono hanno compiti e ruoli ben specifici nell'organizzazione della vita del tumore. Si possono distinguere cellule che hanno lo scopo di contribuire alla costituzione della massa tumorale e cellule capaci di buona motilità e con il compito specifico di invadere e colonizzare nuovi tessuti. Tra queste ultime si anniderebbero le staminali tumorali, le uniche capaci di far proliferare il tumore in un ambiente diverso da quello di origine. L'esistenza di cellule staminali tumorali è stata ben supportata da numerosi studi condotti su leucemie mieloidi acute, dove è stato dimostrato che solo una sottopopolazione cellulare specifica, che esprimeva markers simili alle normali cellule staminali emopoietiche, aveva attività clonogenica in topi immunodepressi (Lapidot et al., 1994; Bonnet and Dick, 1997). Inoltre, cellule staminali tumorali sono state rilevate in studi condotti su tumori cerebrali (Singh et al., 2003; Singh et al., 2004; Galli et al., 2004). Tali studi hanno evidenziato che solo la frazione cellulare staminale CD133⁺, isolata e caratterizzata da tumori è altamente proliferante in vitro e tumorigenica in vivo. L'identificazione di tali cellule ha dato un notevole supporto all'ipotesi che alla base dell'insorgenza e soprattutto del mantenimento dei tumori solidi ci siano cellule staminali tumorali. Studi analoghi, effettuati su tumori di origine epiteliale quali quello della mammella (Al-Hajj et al., 2003; Dontu et al., 2005) hanno anch'essi evidenziato la presenza nelle lesioni tumorali di cellule con caratteristiche simili alle cellule staminali. E' stato infatti osservato che solo le cellule CD44⁺CD24⁻ (Ponti et al., 2005), isolate dal tumore della mammella, sono capaci di generare tumori in topi immunodepressi. Cellule staminali tumorali sono state identificate in diversi altri tipi di tumore come quello del colon, della prostata, del polmone, nei carcinomi epatocellulari, ed in molte altre neoplasie (Zou, 2008; O'Brien et al., 2007; Maitland and Collins, 2008). Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che tali

cellule risultano resistenti alle terapie antitumorali come la chemioterapia e la radioterapia e pertanto sarebbero responsabili della ripresa della malattia, anche dopo diverso tempo dall'asportazione della massa tumorale, o da lunghi periodi di trattamento farmacologico apparentemente eradicanti (Sell, 2004; Al-Hajj et al., 2004; Trosko et al., 2005). Pertanto, risulta cruciale la possibilità di identificare nei tumori cellule staminali tumorigeniche al fine di comprendere i meccanismi che regolano la loro crescita, la sopravvivenza ed espansione, consentendo l'individuazione di trattamenti specificatamente diretti verso tali bersagli cellulari.

CD133 (PROMININA-1): MOLECOLA UTILE PER L'IDENTIFICAZIONE DI CELLULE STAMINALI

CD133, noto anche come Prominina-1, è il prodotto di un gene a singola copia localizzato sul cromosoma 4 (4p15.33) del genoma umano e sul cromosoma 5 del genoma di topo (5B3). Entrambi i geni, sia umano che di topo, presentano un'organizzazione genomica simile, consistente di 37 e 34 esoni, rispettivamente, lunghi circa 160 kb. Il trascritto misura circa 4.4 kb (Shmelkov et al., 2005).

La Prominina-1 è una glicoproteina transmembrana di 865 aminoacidi (aa) con un peso molecolare di circa 120 kDa. Essa è costituita da un dominio N-terminale extracellulare, cinque domini transmembrana con due larghi loops extracellulari glicosilati e una coda terminale di 59 aa citoplasmatica. L'analisi della sequenza aminoacidica della Prominina-1 mostra otto potenziali siti di N-glicosilazione: cinque sul primo loop extracellulare e tre sul secondo (Mizrak et al., 2008) (fig. 6).

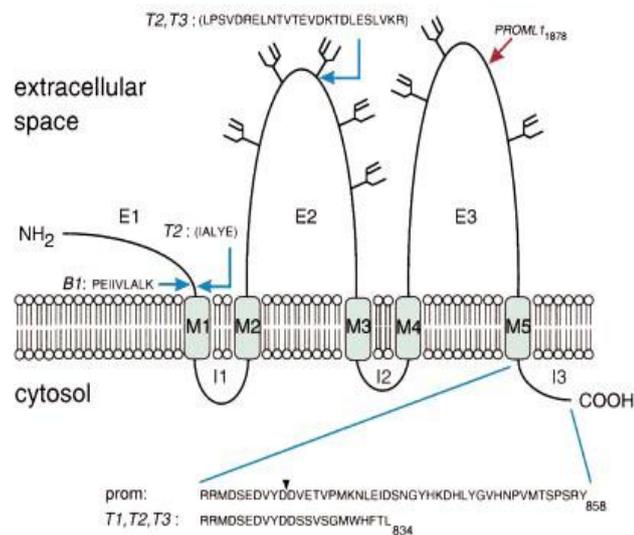


Fig. 6 – Modello topologico della Prominina-1. E' costituita da un dominio N-terminale extracellulare, cinque domini transmembrana con due larghi loops extracellulari glicosilati e una coda terminale citoplasmatica. (Journal of Cell Science 1999).

La Prominina-1 è stata isolata per la prima volta da cellule staminali neuroepiteliali di topo e fu chiamata così per la sua localizzazione prominente in particolari

microdomini di membrana ricchi di colesterolo (Weigmann et al., 1997). La Prominina-1 omologa umana è stata isolata per la prima volta da cellule staminali ematopoietiche, anch'essa localizzata in determinate protrusioni della membrana plasmatica (Corbeil et al., 2001). La Prominina-1 è filogeneticamente conservata, infatti, è stata trovata in *C. elegans*, in *Drosophila* ed in Zebrafish, inoltre, sono state identificate numerose isoforme di splicing alternativo, sia murine che umane, che presentano una distribuzione tessuto-specifica (Yu et al., 2002). La trascrizione di tale gene è regolata da cinque promotori alternativi, tre dei quali sono localizzati dentro un'isola CpG e, pertanto, può essere in parte regolata attraverso la metilazione. I trascritti della Prominina-1 contengono uno dei cinque esoni alternativi, presenti nella regione 5'-UTR (untranslated region), che vengono espressi in maniera tessuto-specifica. E' possibile che la presenza di esoni differenti, dentro la 5'-UTR, possano influenzare lo splicing alternativo della regione codificante sottolineando il ruolo determinante dei promotori alternativi nell'espressione delle varie isoforme (fig. 7) (Shmelkov et al., 2004)

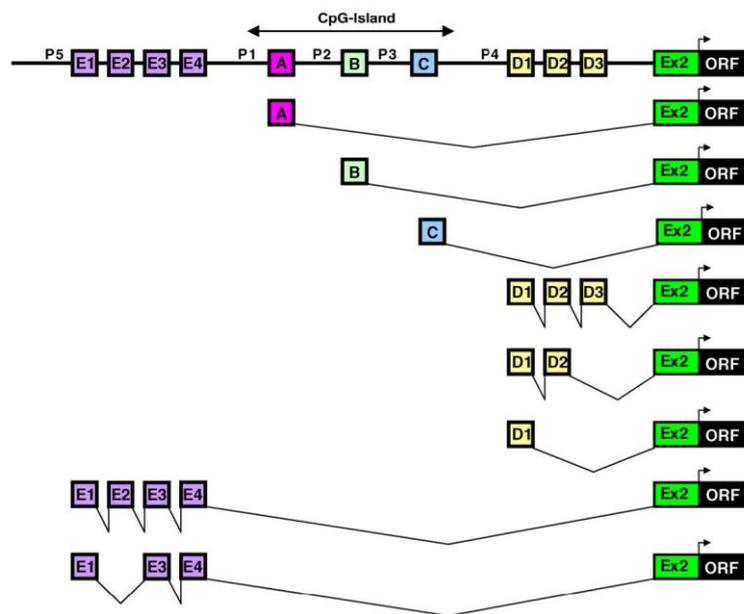


Fig. 7 – Organizzazione genomica della regione promotrice del gene umano CD133 e lo splicing alternativo all'interno della sua 5'-UTR (untranslated region). Gli esoni 1A-1E all'interno della 5'-UTR vengono espressi alternativamente insieme all'esone 2. L'inizio della traduzione si trova nell'esone 2. P1-P5 sono promotori alternativi per il gene umano della Prominina-1. I promotori P1-P3 sono localizzati dentro l'isola CpG. (The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2005).

La funzione della Prominina-1 è ancora poco chiara e, inoltre, non si conoscono né i ligandi né interazioni con molecole intracellulari. Analisi genetiche hanno dimostrato che mutazioni del gene sono associate con la degenerazione della retina (Maw et al., 2000). Vista la sua peculiare locazione nelle protrusioni di membrana come i microvilli delle cellule epiteliali, è stato ipotizzato un suo coinvolgimento nell'organizzazione topologica della membrana plasmatica (Corbeil et al., 2001). Inoltre, le interazioni tra CD133 ed il colesterolo, all'interno di determinati microdomini, suggeriscono che tale fattore potrebbe essere importante nel mantenere un'appropriata composizione lipidica della membrana plasmatica (Roper et al., 2000). Marzesco et al (2005) hanno evidenziato la presenza di piccole particelle di membrana contenenti CD133 nel fluido ventricolare nel tubo neurale rilasciate durante lo sviluppo del topo, nella saliva umana, nel fluido seminale e nelle urine, in concomitanza con la regressione dei microvilli e la formazione di protuberanze pleiomorfiche nel neuroepitelio embrionale, suggerendo il ruolo di CD133 nella regolazione della struttura della membrana plasmatica. Inoltre, è stato visto, nelle cellule di carcinoma colon-retto Caco2, che il rilascio di tali vescicole è associato col differenziamento, supportando il ruolo di CD133 come marker staminale. Pertanto, tutti questi dati sembrano confermare che l'espressione di CD133 è ristretta ad un fenotipo cellulare staminale la cui perdita, attraverso il rilascio di vescicole, è strettamente correlata all'induzione del differenziamento (Marzesco et al., 2005). A supporto di ciò, è stato dimostrato che cellule di fegato umano $CD133^+CD34^+CD3^-$ (Hao et al., 2003) e cellule $CD133^+$ derivate dalla pelle sono capaci di differenziare in cellule neurali ed astrociti (Belicchi et al., 2004). Studi in vivo, inoltre, hanno dimostrato che cellule epiteliali dello strato basale della prostata, esprimenti CD133, mostrano non solo un elevato potenziale proliferativo, ma anche la capacità di rigenerare totalmente l'epitelio prostatico differenziato con l'espressione di prodotti secretori (Richardson et al., 2004). Pertanto, la Prominina-1 rappresenta un importante marker per identificare popolazioni di cellule staminali. Tuttavia, rimane ancora poco chiaro se e come la Prominina-1 possa influenzare le proprietà cruciali delle cellule

staminali come autorigenerazione (self-renewal) e capacità di differenziare in diversi tipi cellulari.

Inoltre, oggi, come già detto, è stato dimostrato in diversi modelli di tumore umano che le lesioni tumorali sono costituite da popolazioni eterogenee in cui la presenza di cellule con caratteristiche staminali può essere evidenziata mediante opportuna analisi fenotipica. Infatti, sono stati sino ad ora utilizzati una grande varietà di markers come CD34, ma soprattutto CD133 e CD24, spesso affiancati da molecole implicate nei fenomeni migratori quali CD44, CD29, CD31 ed altre integrine, per individuare le cellule staminali tumorali, note anche come TICs (tumour-initiating cells) (Burkert et al., 2006). In particolare, numerosi studi mostrano che CD133 risulta espresso in maniera significativa nelle popolazioni TICs (tumor initiating cells) di diverse neoplasie come medulloblastoma, glioblastoma, oligoastrocitoma, retinoblastoma, tumore della prostata e carcinoma del colon (Singh et al., 2003; Salmaggi et al., 2006; Ricci-Vitiani et al., 2007; Collins et al., 2005; Yi et al., 2007). Tali studi, infatti, hanno dimostrato che solo queste cellule presentano un'attività clonogenica e sono capaci di generare tumori in topi immunodepressi. Inoltre, diversi studi evidenziano come le TICs CD133+ risultano resistenti sia al trattamento chemioterapico che a quello radioterapico (Bao et al., 2006; Frank et al., 2005; Hambardzumyan et al., 2006; Frank et al., 2003). I meccanismi molecolari responsabili della resistenza delle cellule staminali agli agenti chemioterapici sono ancora poco chiari anche se l'espressione dei trasportatori ABC (ATP-binding cassette) potrebbe rappresentare un possibile meccanismo (Dean et al., 2005). Per esempio, Liu et al. hanno dimostrato che la resistenza, delle cellule CD133+ di glioblastoma ai chemioterapici, è dovuta probabilmente all'incremento dell'espressione di ABCG2 e del gene MGMT (gene del DNA-mismatch repair). Inoltre, tali cellule sono caratterizzate da elevati livelli di espressione di geni anti-apoptotici come Bcl-2, FLIP, IAP2, XIAP e survivina (Liu G et al., 2006). Pertanto, questi dati supportano il ruolo di CD133 come marker per l'identificazione di cellule staminali tumorali.

TRASPORTATORI ABC (ATP-binding cassette): RUOLO CHIAVE NELLA RESISTENZA AI CHEMIOTERAPICI E NELL'IDENTIFICAZIONE DI CELLULE STAMINALI

La resistenza agli agenti chemioterapici è uno dei principali problemi legati alla terapia antitumorale. Diversi tipi di tumori quali tumore a piccole cellule del polmone e tumori del colon-retto mostrano quella che viene definita resistenza primaria o naturale, per cui fin dall'inizio del trattamento i chemioterapici standard risultano inefficaci, mentre, altri tipi di tumori, inizialmente sensibili, acquisiscono la resistenza, agli agenti antitumorali in un secondo momento. La resistenza alle droghe antitumorali, nota anche come "Multidrug resistance" (MDR), è particolarmente problematica nel caso della resistenza acquisita, poiché una cellula tumorale, esposta inizialmente ad un agente antitumorale, acquisisce la resistenza a più agenti, strutturalmente e funzionalmente differenti dal primo. I principali meccanismi responsabili di tale fenomeno sono: 1) attivazione di proteine transmembrana capaci di escludere diverse sostanze chimiche dalle cellule; 2) attivazione di enzimi implicati nei processi di detossificazione; 3) alterazioni di geni e proteine coinvolte nel controllo dell'apoptosi come p53 e Bcl-2 (Stavroskaya, 2000). Il classico meccanismo di resistenza, noto come MDR (Multidrug resistance), è correlato principalmente con l'espressione delle pompe di efflusso sulle membrane cellulari. Queste sono capaci di ridurre attivamente la concentrazione di chemioterapico nelle cellule tumorali al di sotto del valore necessario per espletare l'attività (Dean et al., 2005).

La maggior parte di queste pompe di efflusso appartiene alla superfamiglia di proteine transmembrana ATP-dipendenti, detta **ATP-binding cassette (ABC)**. Queste proteine sfruttano l'energia sviluppata dall'idrolisi dell'ATP per trasportare ed espellere all'esterno della cellula, una grande varietà di molecole, come cationi organici, aminoacidi, antibiotici, proteine e polisaccaridi. Attualmente sono noti più di 50 geni ABC, alcuni dei quali sono correlati a diverse malattie nell'uomo come la fibrosi

cistica, la sindrome di Dubin-Johnson, la malattia di Byler, la malattia di Stargardt e molte altre (Dean et al., 2001; Efferth, 2001).

A questa famiglia appartengono diversi fattori che sono stati identificati anche in diverse cellule tumorali come la MDR1(P-gp, ABCB1), la multidrug resistance associated protein(MRP), la breast cancer resistance associated protein (BCRP), chiamata anche mitoxantrone resistance protein (MXR), o ABCG2 ecc.

In particolare, **P-glicoprotein** è la più studiata tra le pompe d'efflusso. Essa è una glicoproteina con un peso molecolare di circa 170 kDa, prodotta dal gene *mdr-1*, ed è costituita da due domini omologhi separati da un flessibile polipeptide linker di 58 aminoacidi. Entrambi questi domini presentano un segmento idrofilico N-terminale, sei α -eliche transmembrana e un C-terminale anch'esso idrofilico. Nella porzione intracitoplasmatica, vicino al C-terminale, sono presenti sia il sito di riconoscimento per le varie sostanze, che i due siti di legame ed idrolisi dell'ATP. La P-gp sfrutta l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP per espellere fuori dalla cellula, contro gradiente, una grande varietà di sostanze di sostanze diverse, compresi prodotti del metabolismo della cellula, lipidi, steroidi, farmaci cationici, anionici o elettricamente neutri (fig. 8A). Per questa sua caratteristica conferisce, alle cellule che la esprimono, la capacità di sviluppare resistenza verso molti farmaci che sono suoi substrati. La P-gp è presente normalmente nelle cellule sane dove svolge molte funzioni fisiologiche; essa spesso risulta overespressa in individui con un'aumentata resistenza alla chemioterapia. Si è visto, che l'overespressione del gene *mdr-1* è alla base dei meccanismi di resistenza intrinseci od acquisiti delle cellule tumorali e, pertanto, la P-gp rappresenta un bersaglio terapeutico importante (Ambudkar et al., 2003).

BCRP (ABCG2) è il membro più recente della super famiglia dei trasportatori ABC . Essa è una proteina di 72 kDa, costituita da un dominio N-terminale e da un solo dominio citosolico, chiamato ATP-Binding, che permette il legame e l'idrolisi dell'ATP. ABCG2 ha un'ampia specificità di substrato; essa infatti è in grado di riconoscere, legare e trasportare all'esterno delle cellule molecole cariche positivamente e negativamente, anioni organici e sulfoni, numerosi farmaci

come le antracicline, gli inibitori della topoisomerasi I e gli antifolici. Proprio per questa sua capacità di estrarre molecole farmacologicamente attive e agenti citotossici limitandone la concentrazione intracellulare, ABCG2, come la P-glicoprotein, è coinvolta nel fenomeno della MDR (Multi-Drug resistance) (fig. 8B) (Al-Hajj et al., 2003; Haimeur et al., 2004; Rocchi et al., 2000; Maliepaard et al., 2001, Litman et al., 2000; Robey et al., 2001; Zhou et al., 2001).

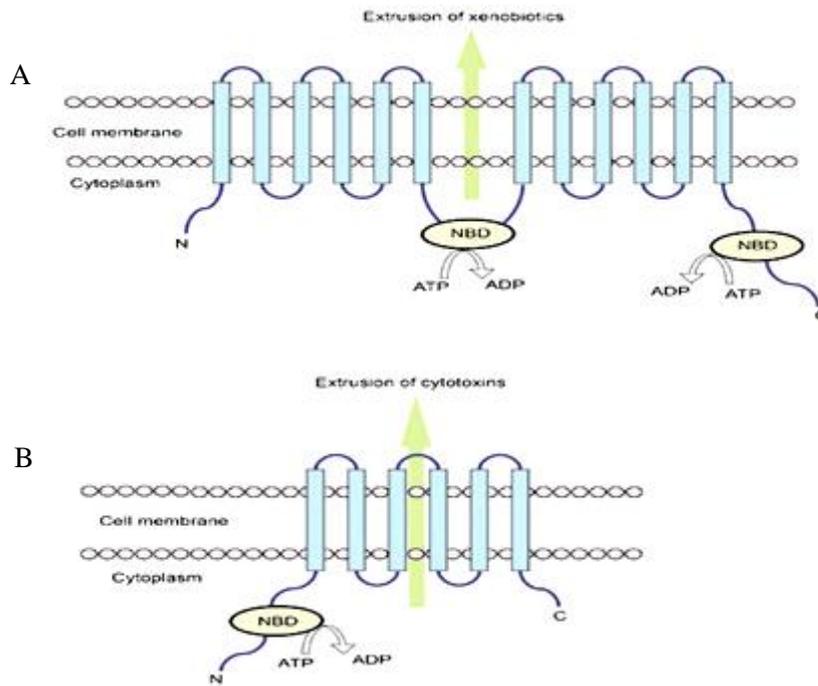


Fig. 8 – A) Struttura della P-glicoprotein; è costituita da un segmento idrofilico N-terminale, sei α-eliche transmembrana, un segmento idrofilico C-terminale, due siti di legame ed idrolisi dell'ATP. B) Struttura della BCRP (ABCG2); è costituita da un dominio N-terminale, e da un solo dominio citosolico chiamato ATP-Binding che permette il legame e l'idrolisi dell'ATP. (Oncogene 2003).

Attualmente tali trasportatori vengono utilizzati come markers per individuare la cosiddetta “**side population**” (SP). Si è visto che, la side population rappresenta una popolazione cellulare arricchita in cellule primitive ed indifferenziate che mostrano caratteristiche staminali quali: l'auto-rinnovamento e la multipotenzialità (ovvero la capacità di generare cellule mature appartenenti a diversi stipi cellulari). L'identificazione e l'isolamento della side population avviene attraverso la valutazione

delle capacità che hanno tali cellule di escludere molecole lipofile, come fluorocromi Hoechst 33342, rodamina 123 ed altre.

In particolare, la tecnica di isolamento della SP è stata descritta per la prima volta da Goodell nel 1996 (Goodell et al., 1996). Tale tecnica si basa sull'impiego del colorante vitale Hoechst 33342, che presenta la caratteristica di emettere simultaneamente due lunghezze d'onda (675nm rosso e 450nm blu), evidenziando un profilo citofluorimetrico in cui la SP si localizza nel quadrante in basso a sinistra (fig 9A). Goodell ha dimostrato che l'esclusione dello Hoechst 33342 è un processo attivo che coinvolge trasportatori ABC, infatti, utilizzando il verapamil, inibitore della MDR1, ha osservato una minore capacità di queste cellule, appartenenti alla SP, di escludere lo Hoechst 33342 quando la pompa è inibita (fig.9B).

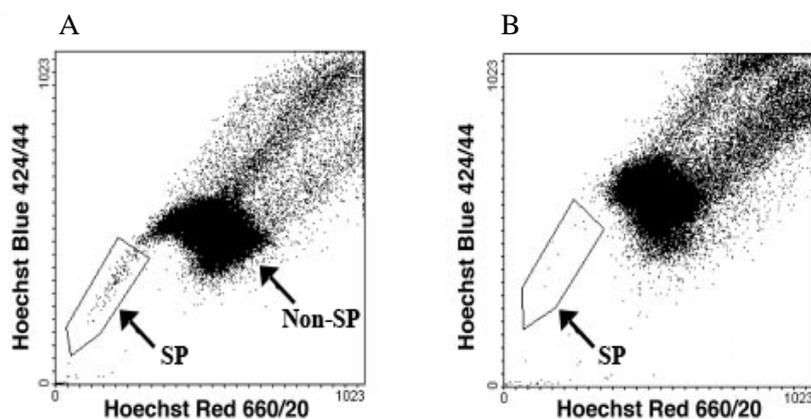


Fig. 9 – Profilo citofluorimetrico dopo colorazione con Hoechst 33342. A) La side population (SP) è rappresentata da una piccola frazione cellulare localizzata in una regione a bassa fluorescenza dello Hoechst (blue e red). Le cellule che ritengono elevati livelli di colorante (alta fluorescenza), non appartenenti alla SP (Non-SP), rappresentano la popolazione principale. B) L'incubazione simultanea dello Hoechst col Verapamil, inibitore della pompa, determina una riduzione dell'efflusso del colorante, causando la scomparsa della SP dalla regione a bassa fluorescenza. (STEM CELLS 2006)

Studi successivi hanno dimostrato che altri trasportatori ABC, in particolare la BCRP, sono implicati nel fenotipo side-population. In particolare, alcuni studi hanno dimostrato che il gene *Bcrp1* (e non i geni *Mdr1a/1b*) è necessario per il fenotipo “side population”, e risulta espresso nelle cellule staminali di diversi tessuti. Pertanto, tale fattore, oggi, viene utilizzato come marker per selezionare cellule staminali. La precisa

funzione fisiologica di BCRP nelle cellule staminali è poco conosciuta, anche se alcuni studi suggeriscono che l'espressione di tale gene sembra proteggere le cellule staminali da substrati citotossici (Mao and Unadkat, 2005).

La side population è stata identificata in molti tessuti normali come le ghiandole mammarie, il polmone, il muscolo, il cuore, il fegato, il cervello e molti altri, ma anche in vari tumori come il neuroblastoma, il melanoma, il glioblastoma, il retinoblastoma, e molti altri (Hadnagy et al., 2006).

Visto il ruolo che tali fattori giocano nella resistenza ai chemioterapici utilizzati per la cura del cancro, si è pensato di ricorrere all'impiego di molecole come ciclofosfamide, 5-fluorouracile ed antracicline modificate (doxorubicina-peptide coniugata, annamicina) che non sono substrati di tali pompe (Consoli et al., 1996; Mazel et al., 2001). Nonostante ciò, i risultati più soddisfacenti, a tutt'oggi, si ottengono dall'impiego simultaneo di agenti antitumorali con sostanze che inibiscono i trasportatori ABC. Queste sostanze potrebbero revertire la resistenza e rendere le cellule tumorali più sensibili ai chemioterapici, pertanto, vengono definiti chemiosensibilizzanti o modulatori MDR. Alcuni di questi agenti agiscono esclusivamente su un trasportatore, mentre altri possono agire su più membri della stessa famiglia.

Molti agenti come il verapamil, bloccante dei canali del calcio, e la ciclosporina A, immunosoppressore, potrebbero inibire la resistenza, indipendentemente dalle loro funzioni farmacologiche, agendo come substrati competitivi della P-glicoprotein (P-gp). Differenti studi clinici hanno dimostrato che tali sostanze sono in grado di revertire la resistenza agli agenti antitumorali. Il Verapamil è stato il primo agente sensibilizzante riportato come inibitore della MDR (Tsuruo et al., 1981) e i suoi effetti sono stati anche confermati da studi clinici più recenti (Belpomme et al., 2000). Purtroppo, tale composto, alle concentrazioni utili per inibire la resistenza, mostra un'elevata tossicità cardiaca; per questo sono stati sviluppati il (R)-verapamil ed analoghi del verapamil che mostrano una bassa tossicità rispetto al (S)-verapamil (Haussermann et al., 1991; Teodori et al., 2002; Toffoli et al 1995). La ciclosporina A

ed altri immunosoppressori incluso l'FK506 e la rapamicina sono capaci di inibire l'MDR. Visti gli effetti immunosoppressori e la tossicità epatica e renale della ciclosporina A, sono stati sviluppati analoghi non immunosoppressori che, come per esempio il PSC-833 (Valspodar), mostrano un'efficienza maggiore rispetto alla ciclosporina A. Questi agenti sensibilizzati, come il verapamil e la ciclosporina A, detti di prima generazione, generalmente mostrano, alle concentrazioni inibenti la resistenza, effetti irrilevanti ed elevata tossicità, per questo motivo sono stati sviluppati agenti chemiosensibilizzati, detti di seconda generazione, come PSC-833, VX-710, LY335979, XR9051 e XR9576 , che risultano più efficaci.

Altro agente degno di nota è la fumitremorgina C (FTC), una tossina prodotta dai funghi, che risulta un potente inibitore della BCRP (breast cancer resistance protein) ma, a causa della sua elevata neurotossicità, l'impiego in vivo risulta limitato. Recentemente, è stato riportato che un analogo tetraciclico della FTC, Ko143, è il più potente inibitore della BCRP e mostra una bassa tossicità.

Infine, visto che i trasportatori ABC possono essere coespressi in molti tipi di cellule tumorali, sono stati sviluppati agenti chemiosensibilizzati contro MRP e/o BCRP e P-gp come il VX-710 (P-gp-MRP), il GF120918 (P-gp-BCRP) e il tRA98006 contro tutti e tre i trasportatori (Choi, 2005).

Da quanto detto risulta chiaro come i trasportatori ABC, oltre ad essere utili markers per l'identificazione di cellule con proprietà staminali, rappresentano anche importanti targets terapeutici.

OSTEOSARCOMA

L'osteosarcoma, è il più frequente tra i tumori dello scheletro. Circa il 60% di tutti gli osteosarcomi insorgono preferenzialmente nel sesso maschile in età compresa tra i 10 e i 30 anni, suggerendo una correlazione con l'età adolescenziale, periodo di massimo accrescimento osseo.

Sedi di più frequente insorgenza risultano le metafisi delle ossa lunghe e i segmenti ossei come tibia, estremità distale del femore, omero prossimale mentre più raramente si manifesta nelle ossa piatte e nella colonna vertebrale. L'osteosarcoma è una neoplasia altamente maligna per la sua capacità di produrre metastasi, principalmente a livello polmonare o in altre sedi ossee. La sua tendenza alla diffusione è talmente elevata, che circa l'80% dei pazienti presenta già micrometastasi alla prima diagnosi della malattia (Picci, 2007).

Si ipotizza la sua origine da una cellula staminale mesenchimale che può differenziare verso un tessuto osseo, fibroso o cartilagineo.

Istologicamente il tessuto sarcomatoso è caratterizzato dalla presenza di cellule fusiformi con nuclei evidenti, con frequenti e atipiche mitosi; sono presenti, inoltre, aree di calcificazione con formazione di tessuto osteoide ed un tessuto osseo, caratterizzato dall'irregolarità della struttura e dall'estremità non controllata, che invade anche le trabecole ossee normali.

Il tumore origina nella cavità midollare dell'osso, e accrescendosi erode lo strato corticale, invadendo i tessuti molli circostanti (fig 10).

La vascolarizzazione del tumore è intensa particolarmente nelle zone con minore tendenza all'ossificazione. Queste sono anche le zone con maggiore aggressività nei confronti dell'osso circostante (Gibbs et al., 2002).



Fig. 10 - Aspetto radiografico dell'osteosarcoma

Sebbene la maggior parte degli osteosarcomi sono sporadici, i principali fattori di rischio associati con la loro incidenza includono l'esposizione a radiazioni o ai chemioterapici, in particolare agenti alchilanti o antracicline, impiegati per la cura di altre forme tumorali. La malattia di Paget, generalmente una condizione benigna caratterizzata da un incremento del turnover del tessuto osseo, potrebbe rappresentare una condizione di rischio di osteosarcoma. Diverse altre condizioni benigne come osteomielite cronica, osteocondroma, encondroma e la displasia fibrosa, sono associate con l'osteosarcoma (Skubitz and D'Adamo, 2007).

Altro fattore per il quale sia stato accertato un sicuro coinvolgimento nell'insorgenza dell'osteosarcoma è rappresentato dalle anomalie genetiche specifiche (mutazioni e /o delezioni) a carico di geni oncosoppressori, come il gene TP53 localizzato nella regione cromosomica 17p13. Infatti, pazienti affetti da osteosarcoma presentano mutazioni o delezioni, parziali o complete, del gene TP53 in circa il 30-50% dei casi, indicando come queste alterazioni genetiche giochino un ruolo importante nella tumorigenesi di questa neoplasia.

Altro fattore genetico predisponente all'insorgenza di osteosarcoma è la delezione del gene oncosoppressore del retinoblastoma (RB1), localizzato nella regione cromosomica 13q14. La perdita parziale o completa del gene RB1 è responsabile dell'insorgenza del retinoblastoma, un tumore della retina che insorge in età infantile. È stato ampiamente dimostrato che i pazienti affetti da retinoblastoma ereditario, in cui entrambi gli alleli del gene RB1 risultano alterati, presentano un rischio di sviluppare osteosarcoma, in età adolescenziale, di circa 500 volte maggiore di quello presente nella popolazione normale. Inoltre, delezione completa o parziale del gene RB1 è stata ritrovata in circa il 60% degli osteosarcomi, confermando ulteriormente come questa anomalia genetica sia il fattore predisponente all'insorgenza non solo del retinoblastoma ma anche della maggior parte degli osteosarcomi (Walkley et al., 2008).

In un'alta percentuale di osteosarcomi è presente l'amplificazione dei proto-oncogeni quali MDM2 (murine double minute 2) e CDK4 (cyclin dependent kinase 4) che sembra essere prevalentemente associata ad un maggiore rischio di recidiva locale e a distanza. Inoltre, sono state identificate anche anomalie nei pathways di segnalazione regolati da fattori di crescita come ad esempio IGF-1 o PDGF. La loro espressione genica suggerisce un ruolo importante quali fattori predittivi di cattiva prognosi e apre le porte a nuovi approcci terapeutici (Marina et al., 2004).

L'osteosarcoma si manifesta frequentemente in pazienti che presentano una storia familiare della malattia; in pazienti affetti da retinoblastoma bilaterale ereditario il rischio di sviluppare osteosarcoma è molto elevato.

La sintomatologia è caratterizzata da dolore e tumefazione della zona interessata.

Il quadro radiologico è assai vario e dipende dall'aggressività del tumore e dalla capacità di reazione riparativa dell'osso circostante: si andrà quindi da lesioni esclusivamente litiche, a lesioni circondate da orletti riparativi, a dense aree o lesioni contenenti spicole o strani ammassi radiopachi; spesso si può osservare una discontinuità della regione corticale che sovrasta il tumore.

La diagnosi di osteosarcoma sospettata clinicamente, viene confermata dall'esame istologico che permette di fare diagnosi certa. Essa deve essere sempre completata dallo studio radiografico del polmone per evidenziare eventuali metastasi e dalla scintigrafia.

Il tumore dell'osso, a seconda della sua estensione, può essere in una sola zona (localizzato) o in più zone (metastatico). Sapere se la malattia è localizzata o diffusa è importante per la scelta del trattamento più indicato.

La terapia dell'osteosarcoma è oggi medica e chirurgica contemporaneamente.

Il fattore prognostico più importante per la sopravvivenza a lungo termine è la sensibilità alla chemioterapia. Attualmente le strategie terapeutiche si avvalgono della chirurgia demolitiva allo scopo di rimuovere il più possibile il segmento osseo colpito, preceduta e seguita da chemioterapia. Quest'ultima oggi si avvale dell'impiego di doxorubicina, ifosfamide, cisplatino e metatrexato ad alte dosi con leucovorin per la protezione del midollo. Occorre tuttavia precisare che uno dei fattori limitanti, che in terapia condizionano l'impiego di alcuni di questi agenti chemioterapici, è l'insorgenza di resistenza e di effetti collaterali correlati. Dallo sviluppo di chemio resistenza derivano, di fatto, complicazioni non indifferenti, legate soprattutto ad un incremento progressivo della dose di farmaco da somministrare. D'altra parte l'uso di dosi elevate, tali da superare la resistenza, non è sempre ben tollerato dal paziente a causa dell'elevata tossicità, per cui spesso è necessaria la sospensione del trattamento.

Le varie combinazioni attualmente impiegate di questi farmaci hanno avuto tutto lo stesso successo. L'osteosarcoma è radioresistente per cui la radioterapia risulta inefficace in questo tipo di neoplasie (Bielack et al., 2008; Meyers et al., 2005).

In questi ultimi anni la possibilità di sopravvivenza libera da malattia è migliorata, ma la mortalità è ancora molto elevata.

Un importante obiettivo da perseguire è quello di individuare fattori prognostici biologici da correlare a piani di cura più specifici.

OBIETTIVO DELLA RICERCA

Oggi si ritiene che la trasformazione cancerosa possa avere origine da una cellula staminale alterata, la cosiddetta “cellula staminale cancerosa”. Secondo questa teoria, all’interno della massa tumorale esisterebbe una sub-popolazione cellulare, nota anche come TICs (tumour-initiating cells), con caratteristiche staminali in grado di autorigenerarsi (self-renewal), di proliferare e di differenziare per dare origine alla complessa ed eterogenea popolazione tumorale. Inoltre, tali cellule risultano resistenti alle terapie antitumorali tradizionali, come la chemioterapia e la radioterapia, e, pertanto, sarebbero responsabili della ripresa della malattia anche dopo diversi anni dall’eliminazione della massa tumorale determinata da intervento chirurgico, o da lunghi periodi di trattamento farmacologico apparentemente eradicanti. Tali cellule sono state identificate in diversi tipi di tumore, come quello della mammella, del colon, della prostata, del polmone, nei carcinomi epatocellulari, in diverse neoplasie del sistema nervoso, in diverse leucemie etc. Recentemente è stata dimostrata la presenza di una popolazione cellulare stem-like nell’osteosarcoma umano (Gibbs et al., 2005). L’osteosarcoma è il più frequente tra i tumori dello scheletro. Circa il 60% di tutti gli osteosarcomi colpisce bambini e adolescenti, di età compresa tra i 10 e i 30 anni, quando maggiore è la fase di accrescimento dell’osso; è una neoplasia altamente maligna, con un decorso molto rapido e metastatizzazione precoce al polmone e per contiguità all’interno dello stesso osso o nei tessuti vicini.

Sulla base di queste conoscenze ho sviluppato un progetto di ricerca mirato all’identificazione e caratterizzazione di cellule staminali nella linea cellulare di osteosarcoma umano MG-63. Questo progetto è stato sviluppato nei laboratori del Dipartimento di Scienze Biochimiche, dove da diversi anni, impiegando varie linee cellulari di tumori umani in coltura, si studiano i meccanismi biochimici che sono responsabili della deregolazione della proliferazione, sopravvivenza, differenziamento e apoptosi in tali cellule. In questi laboratori, infatti, esiste una consolidata esperienza nello studio di composti capaci di attivare il processo di morte programmata in linee

cellulari di tumori umani al fine di analizzare i “pathways” apoptotici caratteristici delle diverse linee cellulari e di individuare questi targets per eventuali terapie dirette ad indurre la morte delle cellule tumorali, o di sensibilizzarle all’azione di agenti citotossici o alla terapia radiante (Lauricella et al., 2003; Giuliano et al., 1999; Emanuele et al., 2002; Lauricella et al., 2000; Drago Ferrante R et al., 2008; De Blasio et al., 2003).

In particolare, studi condotti in precedenza in questi laboratori, hanno dimostrato che il trattamento a breve termine (72-96 h) con 3-aminobenzamide (3-AB), inibitore specifico della PARP (poly-ADP-riboso-polimerasi), enzima implicato nella regolazione di numerosi processi cellulari (riparo del danno al DNA, mantenimento della stabilità genomica, organizzazione della cromatina, regolazione della trascrizione e della replicazione, formazione del fuso mitotico, apoptosi e necrosi), induce, nelle cellule di osteosarcoma umano MG-63, il differenziamento morfologico e biomolecolare in osteociti. Il processo è accompagnato da up-regulation di prodotti genici coinvolti nel differenziamento osteocitario (p21/Waf1, osteopontina, osteocalcina, collagene di tipo I, N-caderine, fosfatasi alcalina) e down-regulation di prodotti genici responsabili della proliferazione (ciclina D1, beta-catenina, c-Jun, c-Myc, Id2) (De Blasio A et al., 2005). I risultati hanno suggerito che l’uso di inibitori della PARP può indurre rimodellamenti della cromatina con riprogrammazione dell’espressione genica e attivazione del differenziamento. Studi successivi, condotti sempre negli stessi laboratori, hanno evidenziato che il trattamento prolungato con 3-AB, nelle cellule di osteosarcoma umano MG-63, favorisce l’espressione di un fenotipo cellulare resistente che è stato ipotizzato essere arricchito in elementi cellulari con caratteristiche staminali. Pertanto, sulla base di questa ipotesi, lo scopo della mia ricerca è stato quello di andare a valutare se tale fenotipo cellulare resistente presentasse le caratteristiche delle cellule staminali quali: capacità di autorigenerarsi (self-renewal), elevato potenziale differenziativo, elevata capacità migratoria, elevato potenziale proliferativo e fenotipo MDR.

MATERIALI E METODI

CONDIZIONI DI COLTURA DELLE CELLULE

Linea cellulare di osteosarcoma umano MG-63: le cellule MG-63 (Interlab Cell Line Collection, Genova, Italy) sono caratterizzate dalla inattivazione funzionale del gene TP53 (Diller et al., 1990) e dall'espressione di pRb nella forma wild-type. In aggiunta queste cellule presentano il locus genico per INK4a/ARF deleto (Park et al., 2002), responsabile dell'espressione di p16, inibitore delle CDK 4/6 che intervengono nella transizione G1-S del ciclo cellulare.

Condizioni di coltura: Le cellule crescono in monostrato, adese ad un substrato di plastica, vengono mantenute in coltura in fiasche da 75 cm², in presenza del terreno DMEM trattato con antibiotico (penicillina 100U/ml, streptomina 100µg/ml) e antimicotico (anfotericina B 0,25µg/ml), addizionato con siero bovino fetale al 10% e L-Glutamina 2mM. Le cellule vengono incubate in atmosfera condizionata a 37°C costituita al 95% da aria ed al 5% da CO₂. Inoltre, le cellule vengono distaccate mediante uso di una soluzione tripsina – EDTA.

Per la produzione delle cellule 3AB-OS dalle MG-63, le cellule sono state seminate in capsule da 10 cm (0,5x10⁶ cellule/capsula) e trattate con 3-aminobenzamide (3-AB) o col veicolo (cellule controllo), per i tempi indicati nei risultati. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni tre giorni e la 3-AB fresca è stata aggiunta ad ogni cambio.

La 3-aminobenzamide è stata solubilizzata in Dimetilsolfossido (DMSO), aliquotata e conservata a -20°C. Al bisogno è stata diluita in terreno di coltura al fine di ottenere la concentrazione finale di 5mM in modo che la concentrazione di DMSO non superasse lo 0,25%.

OSSERVAZIONI DELLA MORFOLOGIA CELLULARE

La morfologia cellulare è stata osservata al microscopio rovesciato a contrasto di fase. Le immagini sono state acquisite utilizzando un sistema di immagine computerizzato (camera Leica DC300F e Adobe Photoshop per l'analisi dell'immagine).

SAGGIO DELLE SARCOSFERE

Le cellule MG-63 e 3AB-OS sono state coltivate in multiwell da 6 a bassa aderenza (Corning Inc., Corning, NY) alla densità di 6×10^4 cellule/pozzetto in presenza del terreno N2 con metilcellulosa all'1%. Il mezzo di coltura è stato preparato miscelando 2xDMEM/F12, contenente progesterone (20nM), putrescina (100 μ M), sodio selenite (30nM), transferrina (25 μ g/ml), insulina (20 μ g/ml), fattore di crescita epidermico umano (EGF; 10ng/ml) e fattore di crescita fibroblastico basico umano (bFGF; 10ng/ml), con un egual volume di metilcellulosa al 2%. Aliquote di EGF e bFGF sono stati aggiunti ogni giorno. Dopo 6 e 12 giorni di coltura le colonie sono state contate al microscopio a contrasto di fase (Leica DC300F). Le sfere sono state recuperate, dissociate e riseminate in multiwell da 6 a bassa aderenza nelle medesime condizioni per valutare la loro capacità di autorigenerarsi attraverso la formazione di sfere secondarie (Gibbs et al., 2005). Per ogni linea cellulare sono stati condotti tre esperimenti differenti ognuno dei quali in triplo. Tutti i reagenti sono prodotti dalla Sigma-Aldrich.

SAGGIO DI ESCLUSIONE DELLA RODAMINA 123

Le cellule (1×10^6) sono state incubate in DMEM trattato con antibiotico (penicillina 100U/ml, streptomina 100 μ g/ml) e antimicotico (anfotericina B 0,25 μ g/ml), 10% FBS, L-Glutamina 2mM, per 30 min con rodamina 123 (0,5 μ g/ml – Sigma- Aldrich) con e senza Verapamil (10 μ M – Sigma- Aldrich) per 30 min a 37°C in 5% di CO₂.

Successivamente, le cellule sono state lavate con PBS ed incubate per 1h in assenza di rodamina 123, con e senza Verapamil. La fluorescenza della rodamina è stata misurata al citofluorimetro, BECKMAN COULTER Epics XL, munito di laser argon (488nm) e di un filtro bandpass di 530 nm. Sono stati valutati 10.000 eventi per ogni campione ed il debris è stato eliminato per mezzo del gating in un doppio plot forward contro side scatter; le cellule morte sono state escluse per mezzo della colorazione con ioduro di propidio.

SAGGIO DI ESCLUSIONE DELLO HOECHST 33342 ED ESPRESSIONE DI ABCB1 E ABCG2

Le cellule sono state coltivate in chamber slide (10×10^3 /pozzetto). Quando hanno raggiunto l'80-85% di confluenza sono state incubate a 37°C con Hoechst 33342 (5µg/ml) (bis-Benzimide trihydrochloride - Sigma-Aldrich) per 1 ora. Dopo lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate con anticorpo anti-ABCG2 o anti-ABCB1 (Santa Cruz Biotechnology, inc.) diluito 1:100 (PBS-BSA al 5%) per 1h a temperatura ambiente. Dopo lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate con un anticorpo secondario coniugato con FITC (Santa Cruz Biotechnology, inc.) diluito 1:100 sempre in soluzione di blocking a temperatura ambiente per 1h. Infine, le cellule sono state lavate con PBS e le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza Leica DC300F con il programma Q-Fluoro.

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA MEDIANTE ANALISI CITOFUORIMETRICA

La caratterizzazione fenotipica delle cellule di osteosarcoma umano MG-63 e 3AB-OS è stata effettuata tramite analisi citofluorimetriche. Per tali analisi le cellule sono state marcate con anticorpi monoclonali specifici coniugati con fluorocromi. In particolare, per le analisi dei markers di superficie le cellule sono state marcate con anticorpi contro **CD105** (Endoglin), **CD271** (p75NTR, NGFR) (2µg/ 10^5 cellule; Santa Cruz),

CD117 (cKIT), **CD34**, **CD133** (Prominin-1) (10 μ l/10⁵cellule; Miltenyi Biotec), **CD90** (Thy-1), **CD44**, **CD29** (Integrin β 1), **CD31** (PECAM), **CD24** (10 μ l/10⁵cellule; BD Pharmigen) coniugati con FITC-, PE- o Cy5. Le cellule sono state incubate con l'anticorpo per 30 min a 4°C, al buio. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate due volte con PBS, centrifugate per 8 minuti a 800 rpm, a 4°C, risospese in PBS ed analizzate al citofluorimetro.

Per le analisi indirette, le cellule sono state incubate con anticorpi contro **ABCG2**, **FAK**, **PPAR γ** , **ROR2** (2 μ g/10⁵cellule; Santa Cruz). Successivamente, le cellule sono state incubate, con anticorpi secondari coniugati con -PE o -FITC (2 μ g/10⁵cellule; Santa Cruz). Per le analisi degli antigeni intracellulari è stato utilizzato il kit di fissazione e permeabilizzazione della CALTAG Laboratories.

I campioni sono stati acquisiti con citofluorimetro FACS VantageTM SE (Becton & Dickinson) o BECKMAN COULTER Epics XL. Le analisi sono state eseguite su 5.000-10.000 eventi acquisiti mediante Software CellQuestTM (BD) o Software EXPO 32. L'espressione dei markers è stata misurata rispetto al controllo isotipico.

ANALISI DEI MARKERS DI STAMINALITA' TRAMITE IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule sono state coltivate in chambers slide (10x10³ cellule/pozzetto). Quando hanno raggiunto l'80-85% di confluenza, dopo lavaggi in PBS, le cellule sono state fissate in metanolo/acido acetico in rapporto di 3:1 per 10 min a temperatura ambiente. In seguito, le cellule sono state lavate in PBS per 3 volte ed incubate per 10 min a temperatura ambiente con Hoechst 33342 (5 μ g/ml - Sigma-Aldrich). Dopo lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate con anticorpo anti-Oct3/4, anti-Nanog ed anti-Nuclostemina (Santa Cruz Biotechnology, inc.) diluito 1:100 (PBS-BSA al 5%, con aggiunta di sodio azide 0,05%) per 1h a temperatura ambiente. Dopo lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate con un anticorpo secondario coniugato con FITC (Santa Cruz Biotechnology, inc.) diluito 1:100 sempre in soluzione di blocking, a temperatura

ambiente per 1h. Infine, le cellule sono state lavate con PBS e le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza Leica DC300F con il programma Q-Fluoro.

ANALISI DELLE DIMENSIONI CELLULARI TRAMITE

CITOFUORIMETRIA

La sospensione cellulare è stata centrifugata e risospesa in PBS freddo contenente ioduro di propidio (2 μ g/ml). Per tale analisi è stato utilizzato una laser ad argon a 488nm. Una misura indiretta delle dimensioni è basata sul Forward Scatter il quale è proporzionale alle dimensioni della cellula; a valori più alti di forward corrispondono dimensioni cellulari maggiori. Sono stati valutati 10.000 eventi per ogni campione ed il debris è stato eliminato per mezzo del gating in un doppio plot forward contro side scatter; le cellule morte sono state escluse per mezzo della colorazione con ioduro di propidio. I dati sono stati analizzati con il Software EXPO 32 (Beckman-Coulter).

SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE

Le cellule MG-63 e 3AB-OS sono state coltivate in multiwell da 6 alla densità di 6×10^4 cellule/pozzetto. Le cellule sono state recuperate ogni dodici ore e risospese in PBS. Un'aliquota della sospensione cellulare è stata diluita in una soluzione di trypan blue 0.4% (Sigma-Aldrich) e contate con un emocitometro al microscopio. Le cellule vive escludono il colorante, mentre le cellule morte vengono colorate intensamente dal trypan blue. Il numero di cellule vive, per ogni condizione sperimentale, è stato contato e rappresentato in un grafico lineare. Il tempo di duplicazione (t_d) è stato calcolato secondo la seguente equazione: $t_d = (t_2 - t_1) \cdot \ln 2 / \ln X_2 / X_1$; X_2 e X_1 rappresentano il numero di cellule al tempo t_2 e t_1 .

INDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO

Il differenziamento osteogenico è stato effettuato utilizzando protocolli presenti in letteratura con minori modificazioni (Tondreau T et al., 2004). In breve, le cellule sono state coltivate in multiwell da 6 alla densità di 3×10^4 cellule/pozzetto per tre settimane in terreno osteogenico (DMEM, 10% FBS, antibiotico/antimicotico, L-Glutamina

2mM, supplementato con 0,1µM desametasone (Sigma-Aldrich), 50µM ascorbato-2-fosfato (Sigma-Aldrich), 10mM β-glicerofosfato (Sigma-Aldrich)). Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni tre giorni durante il periodo di incubazione.

Al termine del periodo di differenziamento, nelle cellule sottoposte a differenziamento e nei controlli (coltivati per tre settimane in terreno di coltura non supplementato) è stata valutata l'attività della fosfatasi alcalina e l'espressione dell'osteocalcina, considerati markers del differenziamento osteogenico (Park et al., 2007).

SAGGIO DELLA FOSFATASI ALCALINA

Si basa su un metodo di colorazione “in situ” delle cellule, che evidenzia la comparsa di granuli di colore blu-violetto, indicatori dell'attività dell'enzima. Le cellule sono state lavate con PBS freddo, fissate con una soluzione di etanolo al 90% e formaldeide 3,7% per 2 min e poi lavate con TBS per 10 min. In seguito, le cellule sono state colorate con una soluzione alcalina contenente 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato come substrato e nitroblu tetrazolio come colorante (BCIP/NBT) (Amresco, Ohio, USA) per 10 min a temperatura ambiente. La reazione è stata interrotta rimuovendo la miscela di reazione e lavaggi con acqua distillata.

INDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO

Per il differenziamento in senso adipogenico, le cellule sono state coltivate in multiwell da 6 alla densità di 3×10^4 cellule/pozzetto per tre settimane in terreno di coltura adipogenico (DMEM, 10% FBS, antibiotico/antimicotico, L-Glutammina 2mM, supplementato con 1µM desametasone (Sigma-Aldrich), 0,5mM 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX – Sigma-Aldrich), 10µM insulina (Sigma-Aldrich) e 200µM indometacina (Sigma-Aldrich)). Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni tre giorni durante il periodo di incubazione.

Al termine del periodo di differenziamento, le cellule sottoposte a differenziamento e le cellule controllo (coltivate per tre settimane in terreno di coltura non supplementato) sono state sottoposte a colorazione con Oil-Red O, che colora i depositi di lipidi neutri (Tondreau et al., 2004). Inoltre, è stata valutata, tramite immunofluorescenza,

l'espressione della GLUT-4 (glucose transporter-4), FABP-4 (fatty acid-binding protein-4) e dell'adipsina considerati markers del differenziamento adipogenico (Mauney et al., 2005).

COLORAZIONE “OIL-RED O” PER VALUTARE I DEPOSITI DI LIPIDI NEUTRI

Le cellule sono state lavate con PBS freddo, fissate con una soluzione di formaldeide 4% in PBS per 10 min a temperatura ambiente e poi lavate con acqua distillata. In seguito, le cellule sono state incubate con una soluzione di isopropanolo 60% in acqua distillata per 5min e poi con la soluzione di Oil-Red O (0,5% in isopropanolo) per 10 min. Infine, le cellule sono state lavate con acqua distillata ed osservate al microscopio.

INDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO

Le cellule sono state seminate in multiwell da 6 alla densità di 6×10^4 cellule/pozzetto in terreno di coltura DMEM, supplementato con 10% FBS, antibiotico/antimicotico, L-Glutamina 2mM. Dopo 24h il mezzo di coltura è stato sostituito con il terreno di coltura Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM), contenente 20ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Sigma-Aldrich), 20ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) (Sigma-Aldrich), 10ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Sigma-Aldrich), 0.61g/l nicotinamide (Sigma-Aldrich). Le cellule sono state mantenute in queste condizioni per cinque giorni. Successivamente, nella tappa di maturazione le cellule sono state trattate con IMDM contenente 20ng/ml oncostatin M (OSM; Gibco®Invitrogen), 1 μ M desametasone (Sigma-Aldrich) e 1% di una miscela insulina–transferrina–selenio (Gibco®Invitrogen) per quindici giorni. Per ogni tappa, il mezzo di coltura è stato cambiato ogni tre giorni.

Al termine del periodo di differenziamento le cellule sottoposte a differenziamento e le cellule controllo sono state sottoposte a colorazione PAS (periodic acid-Schiff), che colora i depositi di glicogeno. Inoltre, è stata valutata, tramite immunofluorescenza, l'espressione della citocheratina 18 (CK18), della α -fetoproteina (AFP) e

dell'albumina (ALB) considerati markers del differenziamento epatogenico (Zheng et al., 2008).

COLORAZIONE PAS (PERIODIC ACID-SCHIFF) PER VALUTARE L'ACCUMULO DI GLICOGENO

Le cellule sono state lavate con PBS freddo, fissate con una soluzione di formaldeide 4% in PBS per 2 min a temperatura ambiente e poi lavate con PBS. In seguito, le cellule sono state incubate con una soluzione di acido periodico 1% (Sigma-Aldrich) per 10 min e poi lavate con acqua distillata. Poi, le cellule sono state trattate con il reagente di Schiff (Sigma-Aldrich) per 15 min e lavate con acqua deionizzata (dH₂O) per 5 min. Infine, le cellule sono state marcate con ematossilina di Mayer, lavate con dH₂O per 1 min, ed osservate al microscopio.

INDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO NEUROGENICO

Le cellule sono state coltivate in multiwell da 6 alla densità di 1×10^5 cellule/pozzetto per dieci giorni in terreno di coltura neurogenico NPBM (Neural Progenitor Basal Medium) (BioWhittaker), supplementato con 5 μ M cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (Sigma-Aldrich), 5 μ M 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX - Sigma-Aldrich), 25ng/ml nerve growth factor (NGF) (Sigma-Aldrich), 2.5 μ g/ml insulina (Sigma-Aldrich). Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni tre giorni durante il periodo di incubazione.

Al termine del periodo di differenziamento è stata valutata, tramite immunofluorescenza, l'espressione della MAP-2 (microtubule associated protein-2) e della GFAP (Glial fibrillary acid protein) considerati markers neurogliali (Tondreau et al., 2004).

ANALISI DEI MARKERS DIFFERENZIAATIVI TRAMITE IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule sono state fissate in formaldeide al 4% per 15 min a temperatura ambiente, lavate per 3 volte con PBS. In seguito sono state permeabilizzate con Triton 1% per 10 min e lavate con PBS per 3 volte. Dopo le cellule sono state incubate con anticorpo anti-osteocalcina, anti-GLUT4, anti-FABP-4, anti-adipsina, anti-MAP-2, anti GFAP, anti CK18, anti-AFP (Santa Cruz Biotechnology, inc.) e anti-ALB (R&D Systems), diluito 1:100 (PBS-BSA al 5%, con aggiunta di sodio azide 0,05%), overnight a temperatura ambiente. Per le analisi relative alla GFAP ed alla MAP-2, le cellule sono state prima incubate per 10 min a temperatura ambiente con Hoechst 33342 (5µg/ml - Sigma-Aldrich).

Le cellule sono state lavate con PBS per 3 volte, per rimuovere l'eccesso di anticorpo. In seguito sono state incubate con anticorpo secondario coniugato con FITC (Santa Cruz Biotechnology, inc.), diluito 1:100 sempre in soluzione di blocking, a temperatura ambiente per 1h. Infine, le cellule sono state lavate con PBS e le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza Leica DC300F con il programma Q-Fluoro.

ANALISI DI INVASIVITA' CELLULARE "IN VITRO"

Per valutare il potenziale di invasività delle cellule, MG63 e 3AB-OS, sono state utilizzate delle multiwell da 6 munite di inserti che presentano alla base una membrana porosa rivestita di matrigel (BD Biosciences). Le cellule sono state seminate alla densità di 10^5 cellule/pozzetto all'interno dell'inserto in DMEM senza siero, mentre all'esterno è stato aggiunto DMEM addizionato con FBS al 10% come chemioattrattante. Le cellule sono state incubate per 48h in atmosfera condizionata a 37°C costituita al 95% da aria ed al 5% da CO₂. Le cellule non migrate sono state allontanate dalla superficie superiore della membrana, mentre le cellule migrate nella superficie inferiore della membrana sono state fissate con formaldeide al 4% e colorate con Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Il numero di cellule migrate attraverso il matrigel è stato determinato contando cinque campi con ingrandimento 400X per membrana.

Per ogni linea cellulare sono stati condotti tre esperimenti differenti ognuno dei quali in triplo.

ANALISI DELLA CRESCITA TUMORALE “*IN VIVO*”

Per valutare il potenziale tumorigenico in vivo le cellule MG63 e 3AB-OS (5 x 10⁶/100µl di matrigel) sono state inoculate sottocute nel fianco destro di topi NMRI (Naval Marine Research Institute - topi nudi atimici) maschi di 6-8 settimane di età (Harlan Winkelmann GmbH, Germany). Sono stati utilizzati cinque animali per ogni gruppo di trattamento. Gli animali sono stati mantenuti in un ambiente in condizioni di luce e di temperatura controllate ed in presenza di quantità di cibo ed acqua *ad libitum*. Le dimensioni del tumore sono state monitorate giornalmente tramite un calibro. Dopo circa 48 giorni dall'inoculo gli animali sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale, ed i campioni sono stati fissati in formalina al 10% in PBS o congelati in azoto liquido.

WESTERN BLOTTING

SEPARAZIONE ELETTROFORETICA DELLE PROTEINE

Le cellule coltivate in fiasche da 75 cm², quando hanno raggiunto l'80-85% di confluenza, sono state prelevate, centrifugate a 800 rpm per 10 min ed incubate in un tampone per lisare le cellule (RIPA) (15µl/10⁶ cellule) per 30 min in ghiaccio. Il tampone RIPA è una soluzione costituita da NP-40 1%, sodio deossicolato 0,5%, SDS 0.1%, contenente gli inibitori delle proteasi (aprotinina 25µg/ml, PMSF 1mM, sodio ortovanadato 10nM, sodio fluoruro 10mM, leupeptina 25µg/ml, sodio pirofosfato 0,2 mM). Le cellule sono state quindi sonicate (3 volte per 10 sec) ed il lisato cellulare è stato centrifugato a 15.000xg per 10 min alla temperatura di 4°C. Il contenuto proteico dei singoli soprannatanti è stato determinato mediante il metodo di Lowry (Lowry HO et al., 1951).

Quote contenenti le stesse quantità di proteine (40µg), opportunamente diluite con il tampone di Laemmly (Laemmly U K, 1970), dopo denaturazione per 5 min a 90°C,

sono state caricate su minigel di poliacrilammide la cui concentrazione percentuale varia in rapporto al peso molecolare della proteina da separare. Successivamente il gel è stato sottoposto a scorrimento elettroforetico a 150 V per tempi compresi tra 1 e 2 ore.

TRASFERIMENTO DELLE PROTEINE SU MEMBRANA DI NITROCELLULOSA

Al termine dello scorrimento elettroforetico si è proceduto al trasferimento delle proteine, per elettroblotting, su un filtro di nitrocellulosa (20V per 16h) in presenza di “transfer buffer” (glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS 0,03% metanolo 20%). Dopo il blottaggio il filtro è stato colorato con rosso Ponceau. Questa colorazione è servita a verificare l’avvenuto trasferimento delle proteine sulla membrana e l’omogeneità del contenuto proteico tra i vari campioni. Il filtro, dopo lavaggio con il tampone TBST (tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, Tween 20 0,05%) per allontanare il rosso Ponceau, è stato sottoposto a “detection” con anticorpi specifici (Santa Cruz Biotechnology, inc.). Per ridurre il numero di legami aspecifici il filtro è stato tenuto per 1 ora in una soluzione costituita da TBST e siero albumina bovina (BSA al 5%) o in alternativa proteine del latte. Successivamente è stata aggiunta una soluzione contenente l’anticorpo primario specifico, alla opportuna concentrazione. Dopo incubazione il filtro è stato lavato per 3 volte con intervalli di 10 min in TBST ed incubato per 30 min in una soluzione contenente l’anticorpo secondario (anti-IgG) coniugato con la fosfatasi alcalina (Santa Cruz Biotechnology, inc.), alla diluizione 1:3000 in TBST. L’evidenziazione delle bande è stata effettuata mediante l’aggiunta dei substrati della fosfatasi alcalina: BCIP 3.33%, NBT 6.66% in un tampone costituito da Tris-HCl 100mM, MgCl₂ 5mM, pH 8.9.

Le bande sono state visualizzate Chemidoc ed i dati analizzati con il software Quantity One. L’actina è stata utilizzata come controllo interno.

TECNICA DI ESTRAZIONE DI PROTEINE NUCLEARI E CITOSOLICHE

Gli estratti nucleari e citosolici sono stati preparati seguendo il metodo di Schreiber con qualche modifica (Schreiber et al., 1989). In breve, le cellule sono state distaccate con tripsina, centrifugate, lavate con PBS e riprese con 400 μ l di tampone contenente 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.7 μ g/ml pepstatina, 1 μ g/ml leupeptina, 10 μ g/ml aprotinina e mantenute per 15 minuti alla temperatura di 4°C. Dopo l'aggiunta di 25 μ l di NP-40 al 10% le cellule sono state omogenate mediante l'uso di una siringa. Dopo centrifugazione 400 x g per 5 minuti a 4°C, è stato ottenuto un pellet nucleare (frazione A) e un surnatante (frazione B). La frazione A è stata risospesa in 50 μ l di tampone contenente 20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM KCl; 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.7 μ g/ml pepstatina, 1 μ g/ml leupeptina, 10 μ g/ml aprotinina. I campioni sono stati agitati vigorosamente a 4°C per 30 min e poi centrifugati per 5 min a 4°C a 12.000 x g. Il surnatante è stato utilizzato come estratto nucleare. La frazione B è stata centrifugata per 20 minuti a 12.000 x g a 4°C e il surnatante è stato utilizzato come frazione citosolica. La purezza delle frazioni, citosolica e nucleare, è stata stimata valutando l'actina e la topoisomerasi I rispettivamente. La concentrazione delle proteine ottenute è stata determinata con il metodo Lowry.

ANALISI RT-PCR

L'espressione dei messaggeri delle proteine è stata studiata mediante analisi di RT-PCR. Le cellule coltivate in fiasche da 75 cm², quando hanno raggiunto l'80-85% di confluenza, sono state staccate, contate (6×10^6 per condizione) e lisate in presenza di tampone di lisi contenente β -mercaptoetanolo; il lisato cellulare è stato omogenato con l'uso di una siringa. L'omogenato è stato passato attraverso una colonnina cromatografica di affinità (RNeasy mini Kit Qiagen) allo scopo di isolare lo RNA. Dopo l'estrazione lo RNA è stato quantificato mediante lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm (1 OD = 40 μ g/ml di RNA). Dal rapporto di

assorbanza 260/280 è stato possibile ottenere una stima del grado di purezza dell'RNA; un rapporto ottimale è circa 1,8-2. Per valutare l'integrità, 1µg di RNA è stato sottoposto a scorrimento elettroforetico su gel di agarosio all'1%, in presenza di etidio bromuro (0,5µg/ml), in TAE buffer (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) per 60 min a 90 V. Prima dello scorrimento lo RNA viene mantenuto a circa 95°C per 5 min per denaturare le strutture a forcina e poi trasferito immediatamente in ghiaccio.

La visualizzazione delle tre bande relative allo RNA ribosomale 28S, 18S e 5,8S, in assenza di smear tra queste, consente di stabilire che lo RNA estratto è integro.

RETROTRASCRIZIONE ED AMPLIFICAZIONE

Lo RNA messaggero è stato quindi retrotrascritto in cDNA, copia dalla quale è stato possibile amplificare i geni di nostro interesse.

I preparati (1µg di RNA), dopo aggiunta degli oligo-dT, sono stati inattivati a 65°C per 10 min e trasferiti in ghiaccio. A ciascun campione è stata aggiunta la master mix contenente MgCl₂ 5 mM, PCR Buffer II 1X, dGTP 1 mM, dATP 1mM, dTTP 1 mM, dCTP 1 mM, inibitore dell'RNAsi 1 U/µl, retrotrascrittasi MuLV 2,5 U/µl. Per la retrotrascrizione sono state eseguite le seguenti fasi:

1.Retrotrascrizione: 60 min a 42°C

2.Denaturazione: 10 min a 99°C

3.Raffreddamento: 5 min a 5°C

Il retrotrascritto così ottenuto è stato utilizzato per l'amplificazione dei geni. A 10 µl di cDNA sono stati aggiunti 40 µl di master mix contenente MgCL2 1 mM, PCR Buffer 1X, Taq polimerasi 2,5 U/50 µl ed i primers (concentrazione finale 0,3 µM). Al termine dei cicli di amplificazione i prodotti sono stati evidenziati in un gel di agarosio all'1,5 % in presenza di etidio bromuro (0,5 µg/ml) e poi visualizzati al Chemidoc ed i dati analizzati con il software Quantity One. La GAPDH è stata utilizzata come

controllo interno. Le sequenze dei primers (Proligo USA) utilizzati sono riportate nella tabella 1.

Tabella 1 – Primers utilizzati per RT-PCR

Gene	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
CD133	TCTTGACCGACTGAGACCCAAC	ACTTGATGGATGCACCAAGCAC
Oct3/4	TGGAGAAGGAGAAGCTGGAGCAAAA	GGCAGATGGTCGTTTGGCTGAATA
Nanog	CAAAGGCAAACAACCCACTT	ATTGTTCCAGGTCTGGTTGC
Nucleostemina	GGGAAGATAACCAAGCGTGTG	CCTCCAAGAAGTTTCCAAAGG
Ror2	CCTGGACACGACAGACACTG	AAGTTATGATTTGGGATGTGC
FAK	GCGCTGGCTGGAAAAAGAGGAA	TCGGTGGGTGCTGGCTGGTAGG
Runx2	CTCCCTGAACTCTGCACCAAGTCCT	GGGGTGGTAGAGTGGATGGACG
Osterix	GCCAGAAGCTGTGAAACCTC	GCTGCAAGCTCTCCATAACC
ALP	CACTGCGGACCATTCCCACGTCTT	GCGCCTGGTAGTTGTTGTGAGCATA
Osteocalcina	CCCTCACACTCCTCGCCCTATT	AAGCCGATGTGGTCAGCCAACCTCGT
PPAR γ	ACCCCTATTCCATGCTGTATG	AAGGAATCGCTTTCTGGGTC
β -catenina	CGTGGACAATGGCTACTCAAGC	TCTGAGCTCGAGTCATTGCAGAGGAA
ABCB1	CCCATCATTGCAATAGCAGG	GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA
ABCG2	AGTTCCATGGCACTGGCCATA	TCAGGTAGGCAATTGTGAGG
GAPDH	TGACATCAAGAAGGTGA	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

RISULTATI

PRODUZIONE DELLE CELLULE 3AB-OS DALLE CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO MG-63 TRAMITE TRATTAMENTO PROLUNGATO CON 3-AB.

Le cellule di osteosarcoma umano MG-63, coltivate in capsule petri, sono state incubate in presenza di 3-AB (5mM) o del solo veicolo (DMSO, cellule controllo), come descritto nella sezione “materiali e metodi”. Le colture, osservate al microscopio a contrasto di fase, quando hanno raggiunto lo stato di confluenza sono state distaccate e riseminate in una nuova capsula per favorire l’espansione. Come si può osservare nella figura 1, dopo cinque giorni, le cellule controllo hanno raggiunto lo stato di confluenza e presentano la classica morfologia fibroblastica-bipolare (A). Le cellule trattate con 3-AB dopo 48-72h mostrano riduzione del numero cellulare e si osserva la comparsa di una popolazione cellulare con la morfologia stellata “osteocyte-like” caratterizzata dalla presenza di prolungamenti simili ai dendriti (B). Tali elementi cellulari risultano connessi da strutture canalicolari (C). Queste osservazioni sono in accordo con i risultati già descritti in passato (De Blasio et al, 2003).

La fig. 1D mostra che prolungando il tempo di trattamento, dopo circa sei giorni, si osserva la progressiva morte della popolazione osteocitaria e la comparsa di una nuova popolazione cellulare eterogenea, che rapidamente si espande (E). Dopo circa 15 giorni, quando è stato raggiunto lo stato di confluenza, le cellule sono state distaccate e riseminate in un sistema di coltura fresco in presenza di 3-AB. Dopo questo primo passaggio, le cellule hanno mostrato una velocità di crescita maggiore, infatti hanno raggiunto la confluenza in meno di 7 giorni, e sono state mantenute nelle medesime condizioni per i successivi 15 passaggi (circa 100 giorni). In seguito, le cellule sono state mantenute in assenza di 3-AB per valutare se i fenotipi ottenuti dal trattamento fossero reversibili. La popolazione cellulare così ottenuta è stata coltivata in assenza di 3-AB, per più di 20 mesi (circa 73 passaggi) e non si è osservata alcuna reversione del fenotipo. Tale popolazione cellulare mostra un’elevata capacità di dividersi ed appare composta da tre differenti morfologie cellulari (fig. 1): una poligonale (F); una fusiforme (G); ed una rotondeggiante, debolmente adesa al substrato. In sintesi, la

figura 1 descrive la progressiva sostituzione ed arricchimento delle cellule di osteosarcoma umano MG-63 con una popolazione eterogenea stabile, selezionata dopo trattamento prolungato con 3-AB, composta da elementi cellulari con morfologia poligonale, fusiforme e rotondeggiante. Questa popolazione cellulare eterogenea di osteosarcoma, da noi indicata come 3AB-OS, viene tenuta in coltura nei nostri laboratori, in assenza di 3-AB, da circa due anni. Studi paralleli, condotti sulle cellule MG-63 in assenza di 3-AB, hanno dimostrato che tali cellule possono essere espanse per un numero limitato di passaggi (circa 15) dopo i quali le cellule vanno incontro a senescenza cellulare per poi morire (dato non mostrato).

PRODUZIONE DELLE CELLULE 3AB-OS DALLE CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO MG-63 TRAMITE TRATTAMENTO PROLUNGATO CON 3-AB.

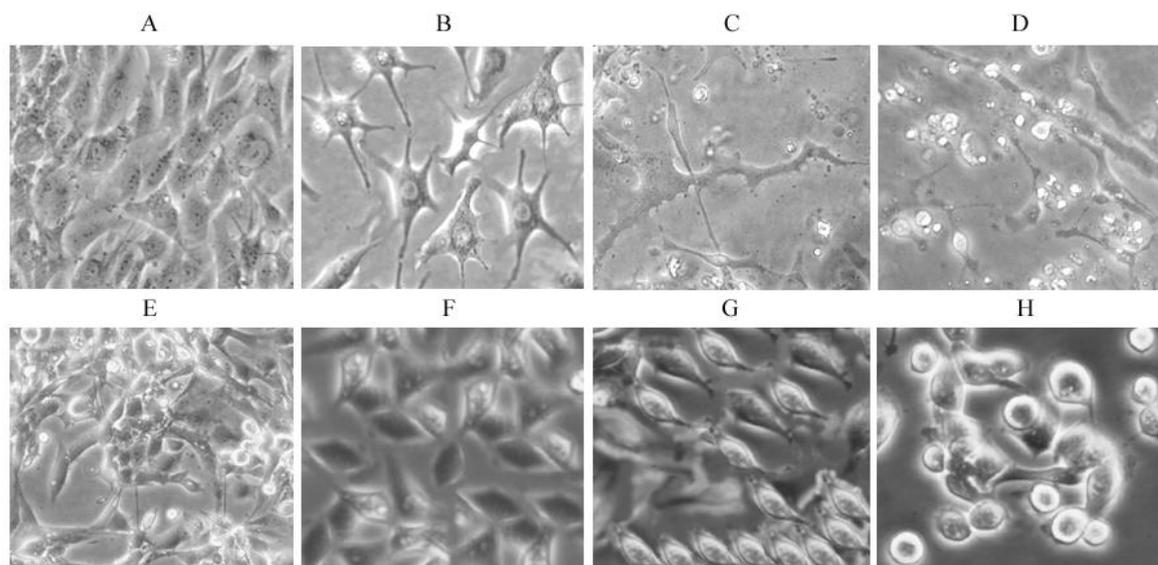


Fig. 1 – La figura descrive la morfologia delle cellule MG-63 trattate con il solo veicolo (DMSO) (controllo, A) o con la 3-AB (5mM) (B-H) analizzati al microscopio a contrasto di fase come descritto nella sezione “materiali e metodi”. Ingrandimento originale 200X.

ANALISI DEL FENOTIPO “MULTIDRUG RESISTANCE” NELLE CELLULE MG-63 E 3AB-OS TRAMITE SAGGI DI ESCLUSIONE DELLA RODAMINA 123 DELLO HOECHST 33342 PER MICROSCOPIA A FLUORESCENZA, CITOMETRIA A FLUSSO E RT-PCR.

Oggi molti ricercatori hanno evidenziato il ruolo chiave svolto dai trasportatori ABC nei meccanismi di resistenza delle cellule tumorali ai chemioterapici. Inoltre, tali trasportatori vengono utilizzati come markers per individuare ed isolare cellule caratterizzate dalla capacità che esse hanno di escludere molecole lipofile, come i fluorocromi rodamina 123 ed Hoechst 33342. Questi criteri sono ampiamente accettati per definire le cellule staminali (Hadnagy et al., 2006).

Pertanto, ho condotto degli studi al fine di valutare la capacità delle cellule MG-63 e delle 3AB-OS di escludere tali coloranti. La figura 2A mostra che le cellule di osteosarcoma umano MG-63, quando sono incubate con la sola rodamina 123 (Rho-123) (pannello sinistro), mostrano una capacità ad escludere il colorante rappresentato da due picchi, uno a bassa fluorescenza (**a**, maggiore capacità di escludere la rho-123), ed uno a maggiore fluorescenza (**b**, minore capacità di escludere la rho-123). Inoltre, la simultanea incubazione delle cellule con rodamina 123 e Verapamil 10 μ M, inibitore della P-glycoprotein/ABCB1 (pannello destro), induce la scomparsa del picco a bassa fluorescenza, suggerendo che questo è dipendente dall'attività della ABCB1. Nelle cellule 3AB-OS (fig. 2B) l'incubazione con la rodamina, con o senza Verapamil, mostra la presenza di un solo picco ad alta fluorescenza (**b**), suggerendo che tali cellule non esprimono la proteina ABCB1.

Analisi di microscopia a fluorescenza (double-staining) condotte, in cellule vive, impiegando il fluorocromo Hoechst 33342 ed anticorpi specifici contro ABCB1 o ABCG2, mostrano una maggiore fluorescenza del blu nelle cellule MG-63 (fig. 2C ed E, pannelli di sinistra) rispetto alle 3AB-OS (fig. 2D e F, pannelli di sinistra); la figura 2 mostra anche che il trasportatore ABCB1 risulta ben espresso nelle cellule MG-63 (C, pannello centrale) e non risulta espresso nelle cellule 3AB-OS (D, pannello centrale), mentre il trasportatore ABCG2 risulta meno espresso nelle cellule MG-63

(E, pannello centrale) rispetto alle 3AB-OS (F, pannello centrale). Infine, nella figura 2 le analisi di sovrapposizione delle immagini (merge) (C-F, pannelli di destra) mostrano che la maggiore capacità di escludere Hoechst 33342 è correlata con l'espressione del trasportatore ABCG2. In figura 2, le analisi citofluorimetriche confermano che le cellule 3AB-OS (H), rispetto alle MG-63 (G), risultano più positive per ABCG2. Inoltre, analisi di RT-PCR semiquantitativa mostrano che ABCB1 (I) è espresso solamente nelle MG63, mentre ABCG2 (L) è espresso a livelli maggiori nelle 3AB-OS. L'insieme di questi risultati, mostrati in figura 2, suggeriscono che l'esclusione dell'Hoechst 33342 è inversamente correlata con l'espressione di ABCB1 e direttamente correlata con l'espressione di ABCG2 e che tale trasportatore risulta più espresso nelle cellule 3AB-OS.

Oggi, diversi studi hanno dimostrato che il gene ABCG2 risulta espresso nelle cellule staminali di diversi tessuti (Ahmed et al., 2008) e, pertanto, i risultati ottenuti suggeriscono che le cellule 3AB-OS potrebbero possedere caratteristiche di staminalità.

ANALISI DEL FENOTIPO “MULTIDRUG RESISTANCE” NELLE CELLULE MG-63 E 3AB-OS.

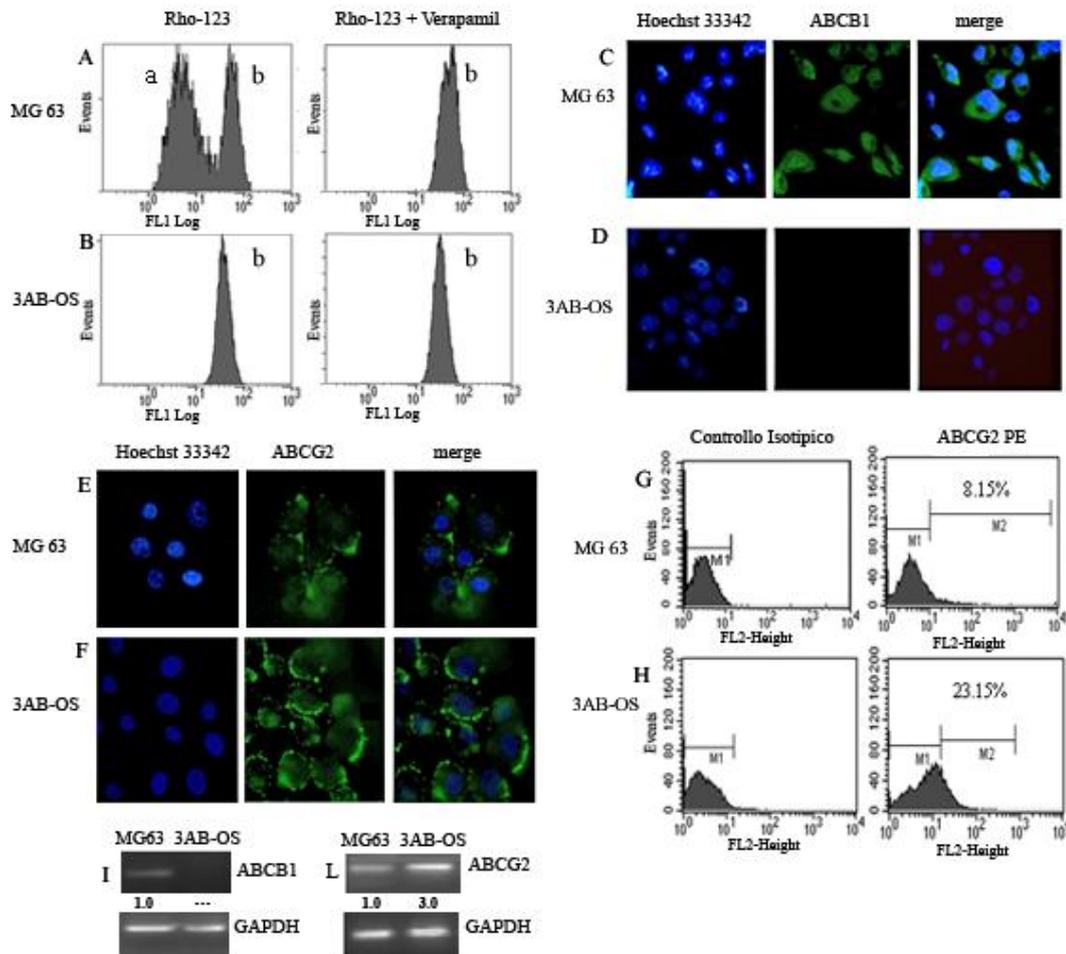


Fig. 2 – Le analisi citofluorimetriche mostrano l’abilità delle cellule MG-63 (A) e delle 3AB-OS (B) di escludere la rodamina 123 (Rho-123). Le cellule sono state incubate con la sola Rho-123 (pannello sinistro) o con la Rho-123 più verapamil (pannello destro). Analisi di microscopia a fluorescenza per valutare la relazione tra l’espressione degli antigeni ABCB1 (C, D) o ABCG2 (E, F) e l’esclusione dello Hoechst 33342 in entrambe le linee cellulari. Per ogni tipo cellulare è stato esaminato l’up-take del colorante e l’espressione dei due trasportatori ABC. L’up-take dello Hoechst (fluorescenza blu, pannelli sinistri C-F); immunoreattività per ABCB1 (fluorescenza verde, pannelli centrali C e D); immunoreattività per ABCG2 (fluorescenza verde, pannelli centrali E ed F); immagini sovrapposte (fluorescenze blu e verde, pannelli destri C-F). I pannelli G ed H mostrano le analisi citofluorimetriche per valutare la positività per ABCG2 nelle cellule MG-63 e 3AB-OS, rispettivamente. Ogni pannello è rappresentazione singola di quattro esperimenti indipendenti. I pannelli I ed L mostrano le analisi di RT-PCR per valutare i livelli di espressione dei trasportatori ABCB1 e ABCG2 rispettivamente in entrambi i tipi cellulari. Le analisi sono state condotte, comparando i livelli di espressione tra le cellule MG-63 e 3AB-OS, ponendo uguale ad 1 i livelli del messaggero nelle cellule MG-63. Ciascuno è la rappresentazione singola di cinque esperimenti indipendenti.

FORMAZIONE DI SFERE NELLE CELLULE MG-63 E 3AB-OS.

Il saggio di formazione delle sfere in vitro è considerato un metodo per isolare le cellule staminali (Clarke et al., 2006). Questo metodo prevede che le cellule vengano coltivate in un sistema di coltura a bassa adesione, in assenza di siero ed in presenza di metilcellulosa per prevenire l'aggregazione cellulare; in queste condizioni, le cellule crescono formando delle sfere derivanti dalle cellule singole.

Per comparare la capacità delle cellule MG-63 e delle 3AB-OS di formare le sarcosfere, quindi di autorigenerarsi, entrambe sono state fatte crescere come descritto nella sezione "materiali e metodi". La figura 3 mostra che entrambe le linee cellulari formano le sfere, ma, dopo 6 giorni di coltura, le 3AB-OS formano un numero di sfere di dimensioni maggiori rispetto a quelle formate dalle MG-63. In particolare, le cellule MG-63 formano sfere con una frequenza di circa $1/750$ (80.00 ± 11.2 colonie/ 6×10^4 cellule), mentre le 3AB-OS formano sfere con una frequenza di circa $1/350$ (171.00 ± 18.4 colonie/ 6×10^4 cellule). Dopo 14 giorni la dimensione delle sfere formate dalle cellule MG-63 e delle 3AB-OS era simile, ma il numero delle sfere formate dalle 3AB-OS era maggiore rispetto a quello delle MG-63. Per valutare la capacità di autorigenerarsi, le sfere formate da entrambe le linee cellulari sono state dissociate fatte crescere in monostrato e, raggiunta la confluenza al 70%, sono state nuovamente riseminate in metilcellulosa. In questa maniera è stata valutata la capacità di formare sfere secondarie (dato non mostrato).

SAGGIO DELLE SARCOSFERE

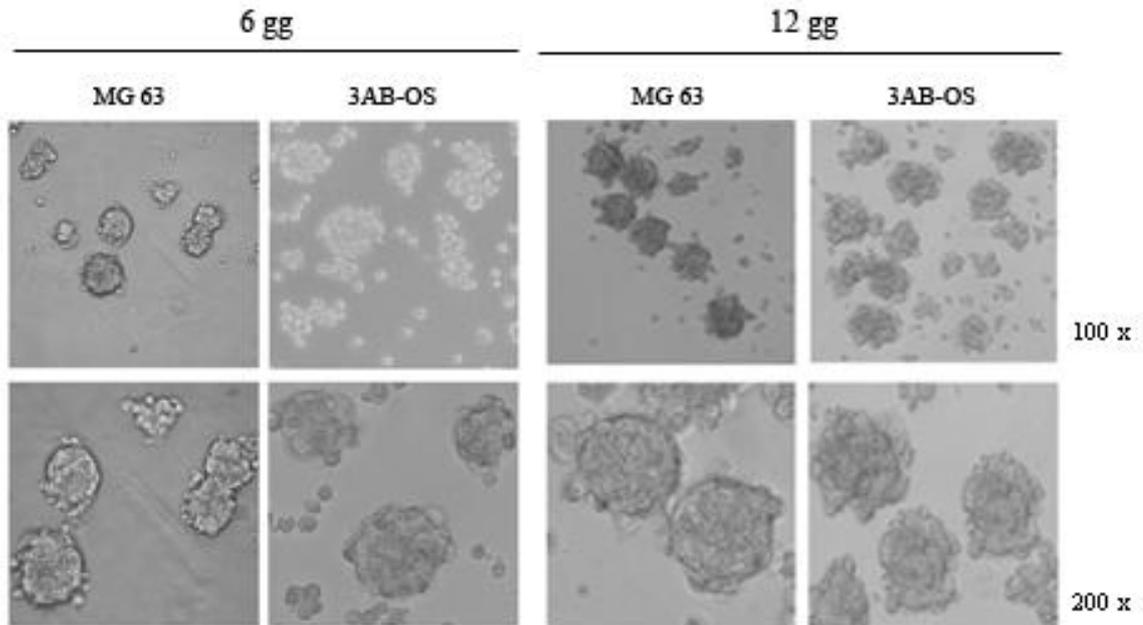


Fig. 3 – Immagini a contrasto di fase delle sarcosfere. Le sarcosfere sono state ottenute piastrando le cellule MG-63 e 3AB-OS alla densità di 6×10^4 cellule/pozzetto in piastre a bassa aderenza e coltivate con un mezzo opportuno, come descritto nella sezione materiali e metodi. Dopo 6 e 12 giorni di coltura, le colonie sono state quantificate al microscopio rovesciato a contrasto di fase.

CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE 3AB-OS: POTENZIALE PROLIFERATIVO, DIMENSIONI E REGOLATORI DEL CICLO CELLULARE.

Oltre alla capacità di autorigenerarsi (self-renewal), le cellule staminali cancerose posseggono le seguenti caratteristiche: elevato potenziale proliferativo (Baguley, 2006); piccole dimensioni (De Paiva et al., 2006); elevata espressione dei regolatori del ciclo cellulare (Herrera et al., 1996). Pertanto, ho condotto alcuni studi, comparando le cellule MG-63 con le 3AB-OS, per valutare tali caratteristiche in entrambe le linee cellulari. I risultati sono riassunti nella figura 4. Come mostra il pannello A, le cellule 3AB-OS, rispetto alle MG-63, posseggono una velocità di crescita maggiore, mostrando un tempo di duplicazione di circa 22 h, contro le 28 h delle MG-63; inoltre, le cellule 3AB-OS possono essere mantenute in coltura per tempi illimitati senza alcuna variazione significativa della velocità di crescita (dato non mostrato). Di contro, le cellule MG-63 possono essere riseminate un numero limitato di volte (circa 15) dopodiché si osserva una riduzione della velocità di crescita seguita dall'entrata in senescenza ed infine la morte cellulare (dato non mostrato). Per valutare il potenziale proliferativo sono stati valutati i livelli di espressione della telomerasi hTERT (human telomerase reverse transcriptase), nota per essere correlata con la capacità proliferativa illimitata delle cellule tumorali (Burns et al., 2005). Come mostra la figura 4E, analisi di western blotting evidenziano che tale proteina risulta espressa ad elevati livelli nelle cellule 3AB-OS, mentre nelle MG-63 i livelli di tale proteina risultano immisurabili. Alcuni studi, noti in letteratura, riportano che le dimensioni cellulari sono strettamente correlate, anche se in modo ancora non del tutto chiaro, al ciclo cellulare, alla proliferazione ed al differenziamento. In figura 4B è riportata un'analisi citofluorimetrica basata sul forward scatter (FSC), misura indiretta delle dimensioni cellulari, in cui si dimostra che le 3AB-OS (**a**) sono notevolmente più piccole delle cellule MG-63 (**b**). In seguito, ho analizzato alcuni regolatori chiave del ciclo cellulare, cominciando dalla proteina Rb che, come è noto, influenza la durata della transizione G1-S e che, quando è assente o alterata, porta ad una riduzione della fase G1 e conseguente riduzione delle dimensioni cellulari. Studi condotti in

precedenza, nei laboratori dove ho condotto i miei studi, hanno dimostrato che le cellule MG-63 mostrano una pRb iperfosforilata, quindi inattiva (De Blasio et al., 2005). In figura 4C sono riportati i dati relativi alla valutazione dello stato di fosforilazione di pRb e di alcuni regolatori della progressione del ciclo cellulare nelle due linee cellulari. Le analisi relative allo stato funzionale della pRb, mostrano che, rispetto alle MG-63, le 3AB-OS esprimono livelli più elevati della forma iperfosforilata/inattiva (**a**, pannello sinistro), inoltre, questo è accompagnato da un potente incremento dei livelli della ciclina D1 (**a**, pannello destro) responsabile della fosforilazione della pRb con conseguente progressione della fase G1-S del ciclo cellulare. Numerosi studi, condotti in cellule tumorali, dimostrano che esiste una correlazione tra i livelli di espressione della ciclina D1 e l'abberrante traslocazione nucleare della β -catenina (Hoang et al., 2004; Shiratsuchi et al., 2007), pertanto ho valutato i livelli di espressione della β -catenina e la sua localizzazione nelle cellule 3AB-OS e nelle MG-63. In figura 4C analisi di RT/PCR (**b**, pannello sinistro) e di western blotting su estratti interi (**b**, pannello destro) mostrano che le cellule 3AB-OS, rispetto alle MG-63, esprimono livelli di β -catenina più elevati. Inoltre, analisi di western blotting, condotte su frazioni cellulari (**c**), dimostrano che le 3AB-OS posseggono livelli nucleari di β -catenina maggiori rispetto alle MG-63. La figura 4D mostra, anche, che le 3AB-OS, rispetto alle cellule MG63, esprimono livelli più elevati di E2F1 (**a**, pannello sinistro), accompagnati anche da maggiori livelli di ciclina E (**a**, pannello destro) e ciclina A (**b**, pannello sinistro) che contribuiscono alla progressione della fase G1-S. Inoltre, le cellule 3AB-OS presentano elevati livelli della ciclina B1 (**b**, pannello destro) e della chinasi ciclina-dipendente cdc-2 (**c**, pannello sinistro), coinvolti nella transizione G2-M. Infine, studi relativi allo stato funzionale della chinasi cdc-2 (**c**, pannello destro), valutando la fosforilazione su tyr-15 (forma inattiva), mostrano che i livelli di p-tyr-15 di cdc-2 sono più bassi nelle 3AB-OS, rispetto alle cellule MG-63. Concludendo, questi risultati suggeriscono che le cellule 3AB-OS mostrano alcune proprietà che sono in accordo con i criteri utilizzati per definire le cellule staminali.

CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE 3AB-OS.

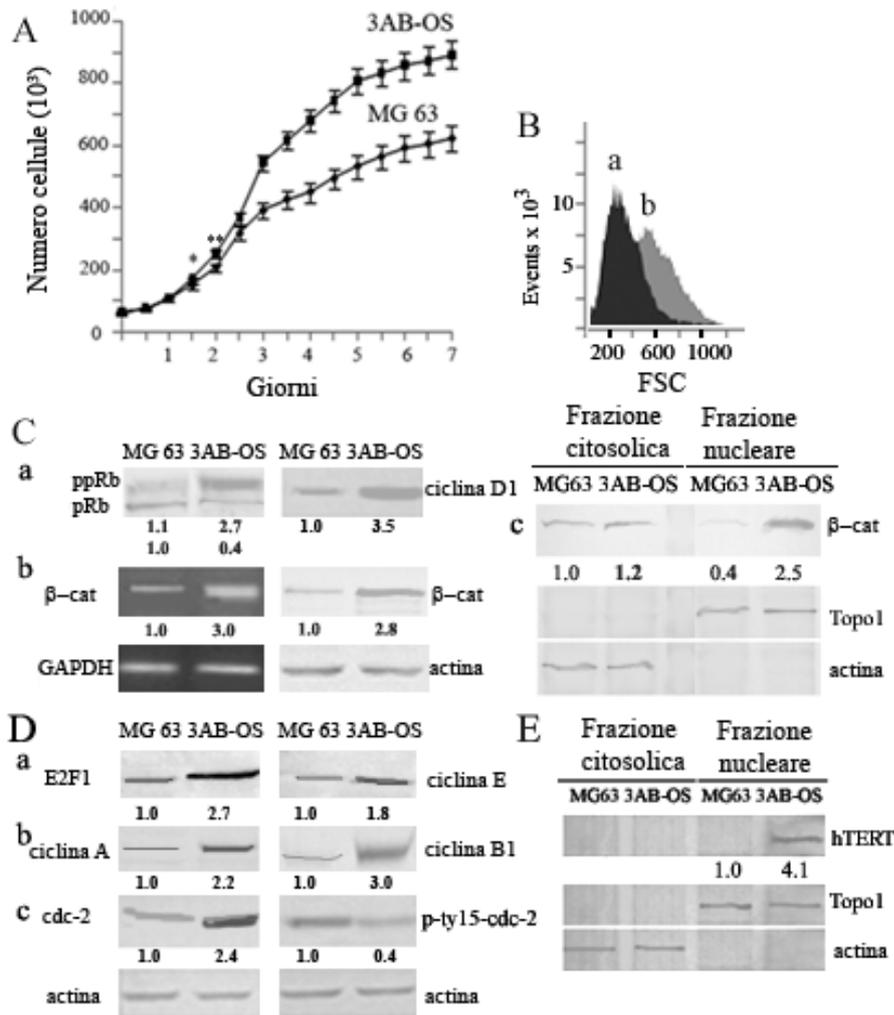


Fig. 4 – A, curve di crescita delle cellule MG-63 e 3AB-OS. I dati sono rappresentati come la media \pm DS di cinque esperimenti differenti con una significatività statistica di * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. B, Analisi citofluorimetriche, basate sul forward scatter, per valutare le dimensioni delle cellule 3AB-OS (a) e delle MG-63 (b); i dati sono la rappresentazione singola di tre esperimenti indipendenti. I pannelli C-E mostrano i risultati relativi alle analisi di western blotting o di RT-PCR. Ciascuno è la rappresentazione singola di esperimenti indipendenti. Le analisi sono state condotte, comparando i livelli di espressione tra le cellule MG-63 e 3AB-OS, ponendo uguale ad 1 i livelli del messaggero o delle proteine nelle cellule MG-63. C e D, analisi di western blotting per valutare i livelli di alcuni regolatori del ciclo cellulare. Il pannello C descrive i livelli di espressione dei livelli della β -catenina tramite analisi di RT-PCR (b, sinistra) e di western blotting condotte su lisati cellulari totali (b, destra) e nelle frazioni nucleari e citosoliche (c). E, analisi di western blotting descrive i livelli di hTERT nelle frazioni citosolica e nucleare.

ANALISI DEGLI ANTIGENI DI SUPERFICIE E VALUTAZIONE DELLO STATO DI COMMITMENT.

Per studiare il fenotipo cellulare ho condotto analisi di citofluorimetria. In particolare, ho valutato l'espressione di alcuni antigeni, che sono utili per l'individuazione di elementi cellulari con caratteristiche staminali, quali: CD105 (Endoglin), CD271 (p75NTR, NGFR), CD117 (c-kit), CD90 (Thy-1), CD44 (Pgp-1), CD29 (Integrin β 1), considerati markers mesenchimali; CD34 e CD133 (Prominin-1), considerati markers emopoietici; CD31 (PECAM) e CD24 considerati markers endoteliale ed epiteliale, rispettivamente.

I risultati ottenuti dimostrano che sia le MG-63 che le 3AB-OS risultano negative per CD34, CD31, CD105, CD271 e CD117 (dati non mostrati) mentre, come mostra la figura 5, entrambe le linee cellulari presentano un'elevata positività per CD90 (A) e CD44 (B); inoltre, le cellule 3AB-OS, rispetto alle MG-63, risultano più positive per CD29 (C) e meno positive per CD24 (D). Il dato più interessante è la forte positività delle cellule 3AB-OS per CD133, considerato un eccellente marker per individuare cellule staminali, che risulta immisurabile nelle cellule MG-63 (E), come confermato anche dalle analisi di RT-PCR (F).

In figura 6 sono mostrate le analisi molecolari per valutare lo stato di "commitment", sia in senso osteogenico che adipogenico, delle cellule 3AB-OS e delle MG-63. Come è possibile osservare, le 3AB-OS risultano meno committed, in entrambi i sensi. Infatti, esse presentano una minore positività e livelli di espressione più bassi, rispetto alle MG-63, di ROR2 e FAK come mostrano le analisi citofluorimetriche (A, B), di RT-PCR e western blotting (C). Inoltre, analisi di RT-PCR (D) mostrano che le cellule MG-63 esprimono, rispetto alle 3AB-OS, livelli di messaggero più elevati di RUNX2, Osterix, fosfatasi alcalina (ALP) ed osteocalcina, considerati markers del differenziamento osteogenico. In maniera del tutto simile, le cellule 3AB-OS risultano, rispetto alle MG-63, meno indotte al differenziamento in senso adipogenico come suggeriscono le analisi citofluorimetriche (E), di RT-PCR e di western blotting (F) relative alla valutazione del marker adipogenico PPAR γ .

ANALISI DEGLI ANTIGENI DI SUPERFICIE

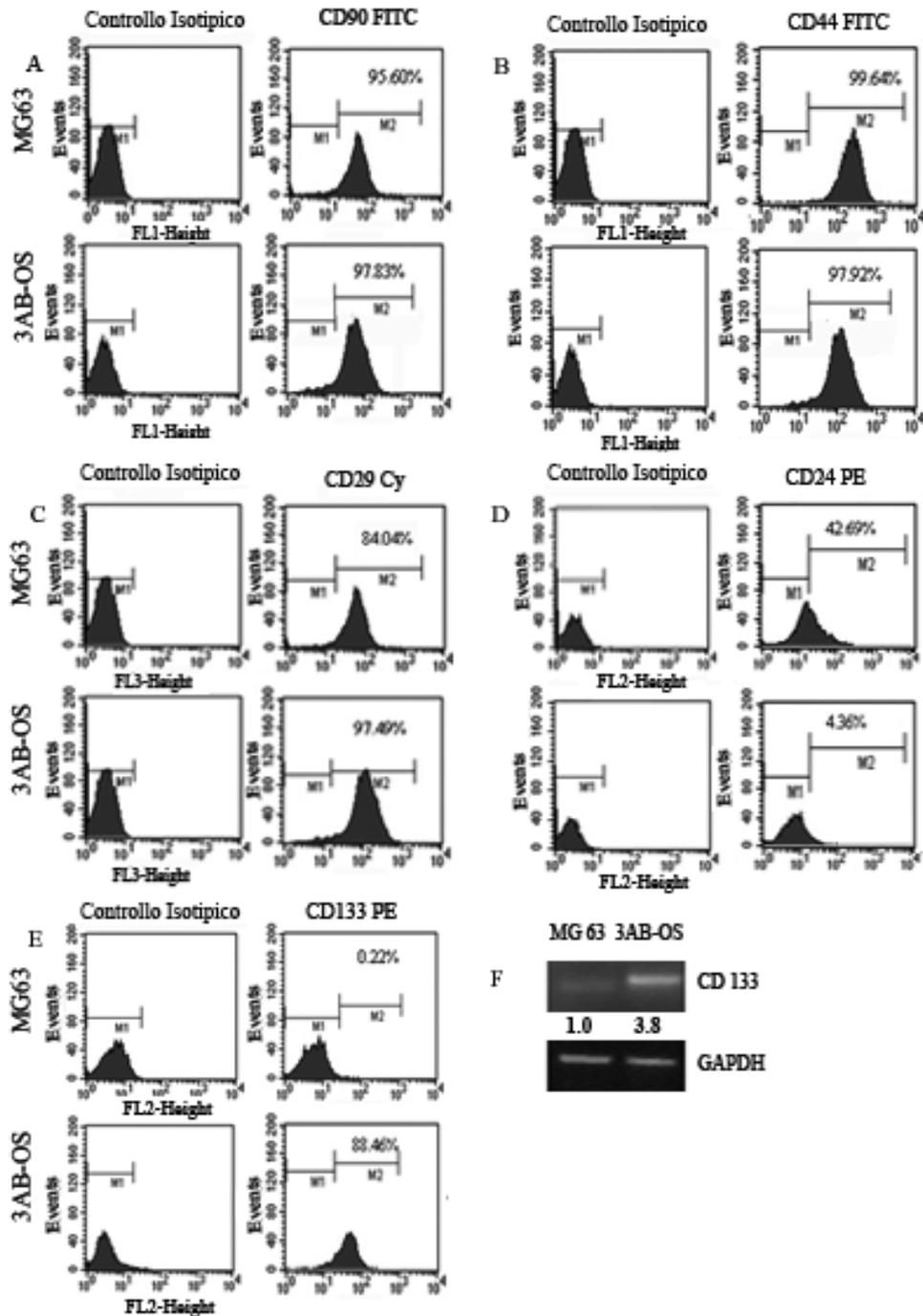


Fig. 5 – Analisi citofluorimetriche per la valutazione degli antigeni di superficie CD90 (A), CD44 (B), CD29 (C), CD24 (D) e CD133 (E) nelle cellule MG-63 (parte superiore di ciascun pannello) e nelle 3AB-OS (parte inferiore di ciascun pannello). La positività per l’antigene (gate M2) viene calcolata rispetto al controllo isotipico (gate M1). Ogni pannello è la rappresentazione singola di tre esperimenti indipendenti. Il pannello F mostra il risultato relativo all’analisi di RT-PCR per CD133. L’analisi è stata condotta, comparando i livelli di espressione tra le cellule MG-63 e 3AB-OS, ponendo uguale ad 1 i livelli del messaggero nelle cellule MG-63.

STUDIO DEL COMMITMENT DELLE CELLULE MG-63 E 3AB-OS.

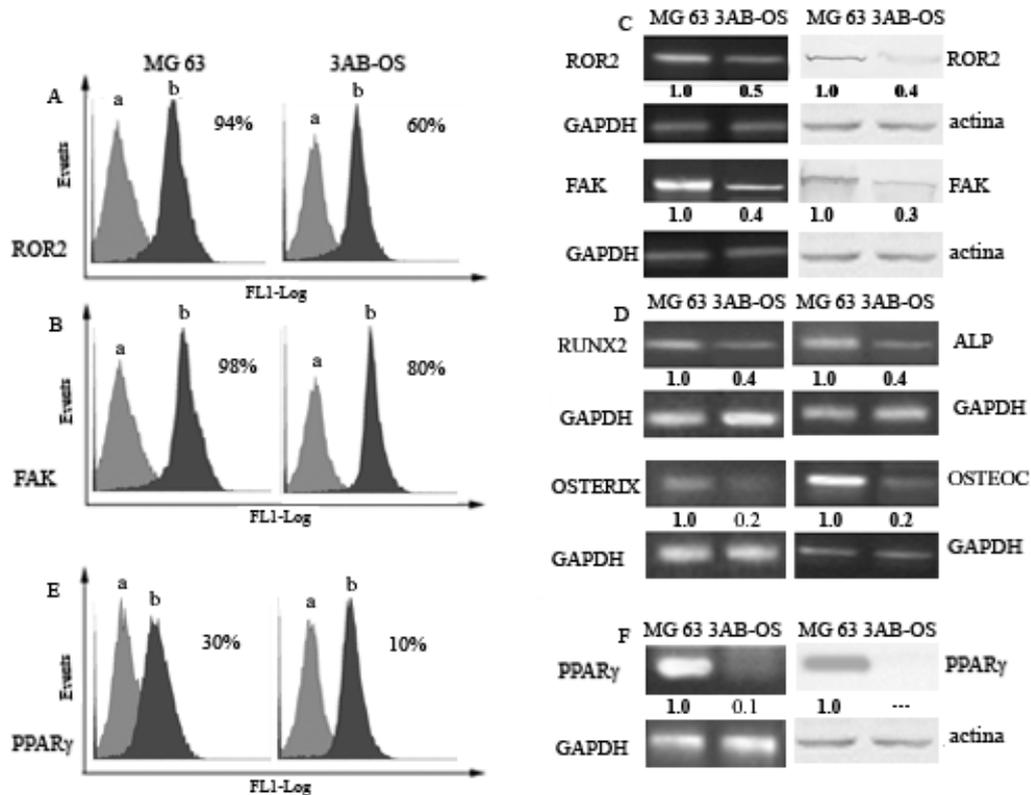


Fig. 6 – I pannelli A-F riportano le analisi dei markers molecolari del differenziamento osteogenico ed adipogenico nelle cellule MG-63 (sinistra) e 3AB-OS (destra). I pannelli A, B e E mostrano le analisi citofluorimetriche relative alla valutazione di ROR2, FAK (markers del differenziamento osteogenico) e di PPAR γ (marker del differenziamento adipogenico), rispettivamente. La positività per l'antigene (b) viene calcolata rispetto al controllo isotipico (a). Ogni pannello è la rappresentazione singola di tre esperimenti indipendenti. I pannelli C, D e F mostrano i risultati relativi alle analisi di western blotting o di RT-PCR relative alla valutazione di ROR2, FAK, RUNX2, Osterix, fosfatasi alcalina (ALP), osteocalcina (OSTEOC) e di PPAR γ . Le analisi sono state condotte, comparando i livelli di espressione tra le cellule MG-63 e 3AB-OS, ponendo uguale ad 1 i livelli del messaggero o delle proteine nelle cellule MG-63. Ogni pannello

ESPRESSIONE DEI GENI DELLA STAMINALITÀ E DEI FATTORI ANTIAPOPTOTICI.

Le cellule staminali embrionali sono cellule pluripotenti caratterizzate dall'espressione di un gruppo di geni (stemness genes) necessari per il mantenimento delle caratteristiche di staminalità. Questi geni includono Oct3/4 e Nanog, due omeoproteine della famiglia POU che giocano un ruolo rilevante nel mantenimento della staminalità, (ossia capacità di autorigenerarsi e pluripotenza), delle cellule embrionali (Pan and Thomson, 2007); esse, inoltre, esprimono la nucleostemina, una proteina capace di legare lo GTP, espressa nei nucleoli delle cellule embrionali e di diverse cellule tumorali, che svolge un ruolo chiave nel controllo della progressione del ciclo cellulare (Ye et al., 2008). In figura 7 sono mostrate le analisi di immunofluorescenza per la valutazione di tali proteine sia nelle cellule MG-63 che nelle 3AB-OS. Come mostra la figura, entrambe le linee cellulari esprimono Oct3/4 (A), nucleostemina (B) e nanog (C); tuttavia nelle cellule 3AB-OS queste proteine, in particolare nanog, risultano maggiormente espresse rispetto alle MG-63, come anche confermato dalle analisi di RT/PCR (D).

Tra i segnali che influenzano la divisione, il differenziamento e la funzione delle cellule staminali, la disponibilità di ossigeno gioca un ruolo chiave e, in particolare, il fattore HIF-1 α (hypoxia-inducible factor) può regolare la funzione della cellula staminale attraverso l'attivazione di numerosi geni che contribuiscono alla sopravvivenza. In molti casi i fattori HIFs inducono l'overespressione di Oct3/4, suggerendo un meccanismo in cui tali fattori possono alterare la funzione della cellula staminale e favorire la crescita tumorale (Semenza, 2007). Analisi di western blotting (E) dimostrano che nelle cellule MG-63 i livelli di HIF-1 α sono immisurabili, mentre risultano elevati nelle cellule 3AB-OS. Questi risultati suggeriscono che le cellule 3AB-OS, rispetto alle MG-63, esprimono livelli maggiori di markers della staminalità.

Spesso le cellule tumorali presentano difetti nei meccanismi che controllano la morte cellulare e, pertanto, la perdita della capacità da parte delle cellule di andare incontro ad apoptosi può contribuire all'insorgenza della malattia. In particolare, i fattori

antiapoptotici come Bcl-2, Flip, gli inibitori dell'apoptosi (IAPs) come XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), IAP-1, IAP-2 e survivina, risultano overespressi in molte forme tumorali (Liu et al., 2006). Questi fattori giocano un ruolo chiave nei meccanismi di resistenza ai chemoterapici antitumorali, rappresentando una delle cause principali dell'insuccesso della chemioterapia per la cura dei tumori. Oggi, si ritiene che tutto ciò possa essere correlato alle cellule staminali cancerose, pertanto, ho ritenuto opportuno valutare i livelli di espressione di tali fattori in entrambe le linee cellulari. Le analisi di western blotting, riportate in figura 7F, indicano che le cellule 3AB-OS presentano, rispetto alle MG-63, livelli più elevati di Bcl-2, FlipL, XIAP, IAP-1, IAP-2 e survivina. Questi risultati suggeriscono che l'espressione incrementata dei fattori antiapoptotici possa rappresentare caratteristica addizionale delle cellule staminali tumorali.

I dati fin qui riportati dimostrano che il trattamento prolungato con 3-AB favorisce l'espressione di una linea cellulare cancerosa "stem-like". Questi risultati sono stati utilizzati per la seguente pubblicazione:

- **R. Di Fiore**, A. Santulli, R. Drago Ferrante, M. Giuliano, A. De Blasio, C. Messina, G. Pirozzi, V. Tirino, G. Tesoriere, R. Vento. Identification and expansion of human osteosarcoma-cancer-cell by long-term 3-aminobenzamide treatment. *Journal of Cellular Physiology* 2009 (in Press).

ESPRESSIONE DEI GENI DELLA STAMINALITÀ E DEI FATTORI ANTIAPOPTOTICI.

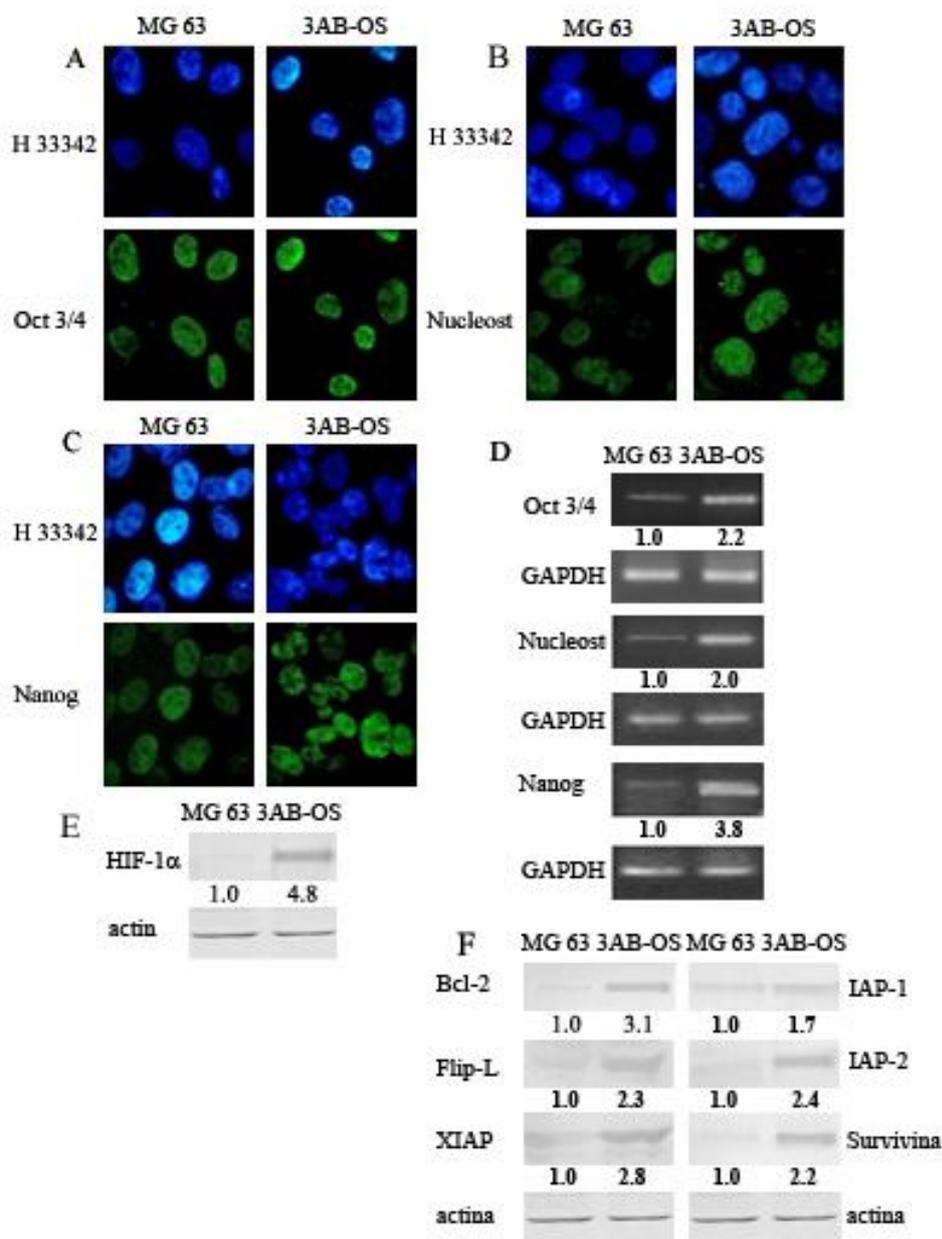


Fig. 7 – A-C, valutazione dei markers di staminalità Oct3/4 (A), Nucleostemina (Nucleost, B) e Nanog (C), nelle cellule MG-63 e 3AB-OS, tramite microscopia a fluorescenza. Le cellule sono state incubate con anticorpi specifici per gli antigeni descritti e i nuclei sono stati contromarcati con Hoechst 33342. Ogni pannello è la rappresentazione singola di cinque esperimenti indipendenti. Il pannello D mostra le analisi di RT-PCR per i markers sopra descritti. Nei pannelli E ed F sono riportate le analisi di western blotting relative a HIF-1 α ed alcuni fattori antiapoptotici, rispettivamente. Ogni pannello è la rappresentazione singola di quattro esperimenti indipendenti. Le analisi sono state condotte, comparando i livelli di espressione tra le cellule MG-63 e 3AB-OS, ponendo uguale ad 1 i livelli del messaggero o delle proteine nelle cellule MG-63.

STUDIO DEL POTENZIALE DIFFERENZIATIVO

Per caratterizzare come “staminale” una linea cellulare, un requisito fondamentale è dimostrare le potenzialità differenziative. Pertanto, ho condotti alcuni studi al fine di valutare la capacità delle cellule 3AB-OS a differenziare in senso osteogenico ed adipogenico, indice di staminalità mesodermale, in senso epatogenico, indice di staminalità endodermale, in senso neurogenico, indice di staminalità ectodermale (Ilancheran et al., 2007). In questi studi le cellule 3AB-OS sono state comparate con le MG-63.

Differenziamento osteogenico. Il primo protocollo di differenziamento che è stato applicato è quello osteogenico, utilizzando metodiche standardizzate in numerosi lavori scientifici. Le cellule MG-63 e 3AB-OS sono state trattate con sostanze differenzianti per un periodo di tre settimane, al termine delle quali, sia nelle cellule controllo, coltivate con semplice terreno di coltura senza supplementi differenziativi, che nelle cellule trattate, sono stati valutati la fosfatasi alcalina e l’osteocalcina, considerati markers del differenziamento osteogenico (Park et al., 2007). In figura 8, pannello B (in alto a destra), sono mostrate le cellule 3AB-OS in condizioni osteogeniche, nelle quali è possibile osservare una potente colorazione blu-violetta, indice dell’attività della fosfatasi alcalina; nello stesso pannello, in basso a destra, è riportata per le stesse cellule l’analisi di immunofluorescenza per la valutazione dell’osteocalcina, che mostra una elevata fluorescenza per tale proteina; a sinistra sono mostrate le medesime analisi condotte nelle cellule non differenziate. Nel pannello A, sono mostrati i risultati relativi alla valutazione dei medesimi markers nelle cellule MG-63. Come si può osservare, le cellule in condizioni osteogeniche (colonna destra) mostrano una colorazione positiva per la fosfatasi alcalina (in alto) ed un incremento della fluorescenza per l’osteocalcina (in basso), rispetto alle cellule non differenziate (colonna sinistra). Tali variazioni, comunque, sono molto inferiori a quelle apprezzate per le cellule 3AB-OS.

Differenziamento adipogenico. Per il differenziamento adipogenico, le cellule MG-63 e 3AB-OS sono state trattate con sostanze differenzianti per un periodo di tre

settimane, al termine delle quali, sia le cellule controllo, coltivate con semplice terreno di coltura senza supplementi differenziativi, che le cellule trattate, sono state sottoposte a colorazione Oil Red O, specifica per i lipidi neutri, e ad analisi di immunofluorescenza per la valutazione della GLUT-4 (glucose transporter-4), della FABP-4 (fatty acid-binding protein-4) e dell'adipsina, considerati markers del differenziamento adipogenico (Mauney et al., 2005). I risultati di queste analisi sono mostrati in figura 9. Nel pannello B (dall'alto verso il basso) sono riportate le analisi condotte nelle cellule 3AB-OS per tali markers. Come è visibile, nelle cellule in condizioni adipogeniche (in alto a destra) sono osservabili, tramite colorazione Oil Red O, diversi depositi di lipidi neutri, di varie dimensioni, caratteristici degli adipociti multivacuolari; nei pannelli inferiori sono riportate le analisi di immunofluorescenza per la GLUT-4, FABP-4 e adipsina, rispettivamente. Come si può osservare, nelle cellule indotte al differenziamento (pannelli di destra), si osserva un incremento della fluorescenza per tali proteine rispetto alle cellule non differenziate (pannelli di sinistra). Nel pannello A sono riportati i risultati relativi alla valutazione dei medesimi markers nelle cellule MG-63. Come si può osservare, le cellule indotte al differenziamento (pannelli di destra), mostrano pochi vacuoli lipidici ed incrementi della fluorescenza appena apprezzabili per la GLUT-4 e la FABP-4 rispetto alle cellule non differenziate (pannelli di sinistra), e nessuna fluorescenza per l'adipsina. Anche in questo caso, le variazioni osservate sono molto inferiori a quelle apprezzate per le cellule 3AB-OS.

Differenziamento epatogenico. Per il differenziamento epatogenico le cellule, MG-63 e 3AB-OS, sono state trattate per un periodo di venti giorni con sostanze differenzianti, come descritto nella sezione materiali e metodi. Al termine del periodo di differenziamento, le cellule indotte a differenziamento e le cellule non indotte sono state sottoposte a colorazione PAS (periodic acid-Schiff), specifica per i depositi di glicogeno, e ad analisi di immunofluorescenza per la valutazione della citocheratina 18 (CK18), della α -fetoproteina (AFP) e dell'albumina (ALB), considerati markers del differenziamento epatogenico (Zheng et al., 2008). In figura 10, pannello A, sono riportate le osservazioni morfologiche per le cellule MG-63 (colonna sinistra) e 3AB-

OS (colonna destra), in assenza (pannelli in alto) ed in presenza (pannelli in basso) degli agenti differenzianti. Come è visibile, le cellule 3AB-OS in condizioni epatogeniche (colonna destra, in basso) acquisiscono una morfologia ovale e cuboidale, ed assumono un'organizzazione simile a quella del lobo epatico duttale. Le cellule MG-63, in presenza degli agenti differenzianti (colonna sinistra, in basso), perdono la morfologia bipolare fibroblastica, ma non acquisiscono alcuna delle morfologie descritte per le 3AB-OS, nelle medesime condizioni.

Per valutare la capacità delle cellule differenziate di sintetizzare glicogeno sono state condotte analisi tramite la colorazione PAS. In figura 10, pannello B, le cellule 3AB-OS indotte al differenziamento (colonna destra, in basso), mostrano un incremento consistente della colorazione PAS, rispetto alle cellule non differenziate (colonna destra, in alto), suggerendo un'elevata capacità sintetizzare ed immagazzinare glicogeno. Nelle cellule MG-63, indotte al differenziamento (colonna sinistra, in basso), è osservabile un leggero incremento di tale colorazione rispetto alle cellule non differenziate (colonna sinistra, in alto). Tali variazioni sono molti minori di quelle apprezzate per le cellule 3AB-OS. Nella figura 11 sono riportate le analisi di immunofluorescenza condotte nelle cellule 3AB-OS per la valutazione della CK18 (pannelli in alto), AFP (pannelli centrali) e ALB (pannelli in basso). Come è visibile, nelle cellule in condizioni epatogeniche (colonna destra) è osservabile una notevole fluorescenza per tali antigeni, mentre nelle cellule non differenziate non è rilevata alcuna fluorescenza (colonna sinistra). Le cellule MG-63, nelle medesime condizioni, non mostrano alcuna positività per tali markers (dati non mostrati).

Differenziamento neurogenico. Per il differenziamento neurogenico le cellule, MG-63 e 3AB-OS, sono state trattate per un periodo di dieci giorni con agenti differenzianti, come descritto nella sezione materiali e metodi. Al termine del periodo di differenziamento, nelle cellule sottoposte a differenziamento e nelle cellule non differenziate, sono stati valutati i cambiamenti morfologici e l'espressione della MAP-2 (microtubule associated protein-2) e della GFAP (Glial fibrillary acid protein), considerati markers neurogliali (Tondreau et al., 2004). In figura 12 sono riportati i risultati di queste analisi.

Come è osservabile, in condizioni neurogeniche (in alto a destra), le cellule 3AB-OS acquisiscono una morfologia tipica delle cellule neurogliali, rappresentata da un corpo cellulare rifrangente e da lunghi processi sottili, simile a quella dei neuroni, oppure, da elementi cellulari che presentano un corpo cellulare largo e processi sottili caratteristici degli astrociti. Inoltre, le analisi di immunofluorescenza, condotte per la valutazione dei markers neurogliali quali GFAP (pannelli centrali) e MAP-2 (pannelli in basso), mostrano che le cellule 3AB-OS, in condizioni neurogeniche (colonna destra), esprimono in maniera consistente entrambi i markers neurogliali; mentre le cellule non differenziate non risultano positive per tali markers (colonna sinistra). Le cellule MG-63, in condizioni neurogeniche, non acquisiscono alcuna morfologia neurogliale e non esprimono nessuno dei markers analizzati (dati non mostrati).

Questi dati dimostrano che le cellule 3AB-OS sono in grado di differenziarsi in vitro, dal punto di vista morfologico, molecolare e funzionale, in tipi cellulari derivanti dal mesoderma, dall'endoderma e dall'ectoderma, suggerendo una staminalità simile a quelle delle cellule pluripotenti.

DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO

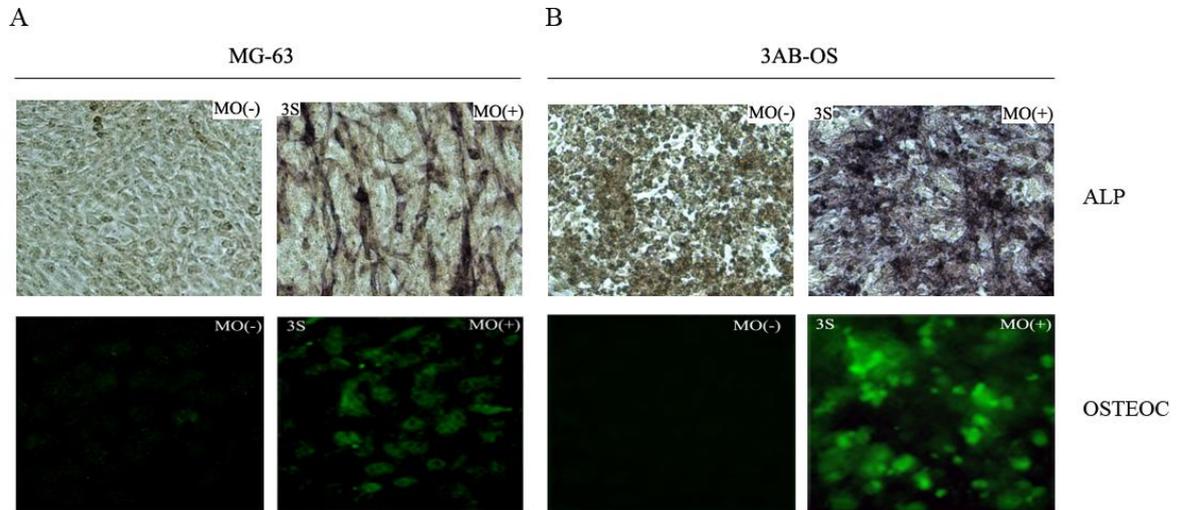


Fig.8 – Analisi dei markers del differenziamento osteogenico. Le cellule MG-63 e 3AB-OS sono state trattate con sostanze differenzianti per un periodo di tre settimane, al termine delle quali, sia nelle cellule controllo, coltivate con semplice terreno di coltura senza supplementi differenziativi, che nelle cellule trattate, sono stati valutati la fosfatasi alcalina e l'osteocalcina. Nel pannello B (in alto a destra), sono mostrate le cellule 3AB-OS in condizioni osteogeniche, nelle quali è possibile osservare una colorazione blu-violetta, indice dell'attività della fosfatasi alcalina; in basso a destra, è riportata l'analisi di immunofluorescenza per la valutazione dell'osteocalcina nelle cellule differenziate; a sinistra sono mostrate le cellule non differenziate. Nel pannello A, sono mostrati i risultati relativi alla valutazione dei medesimi markers nelle cellule MG-63. Le cellule in condizioni osteogeniche mostrano una colorazione positiva per la fosfatasi alcalina (in alto a destra); in basso a destra, è riportata l'analisi di immunofluorescenza per la valutazione dell'osteocalcina nelle cellule differenziate; a sinistra sono mostrate le cellule non differenziate. Ogni pannello è la rappresentazione singola di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento originale 100X per le immagini relative alla valutazione della ALP; ingrandimento originale 400X per le immagini relative alla valutazione dell'osteocalcina.

DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO

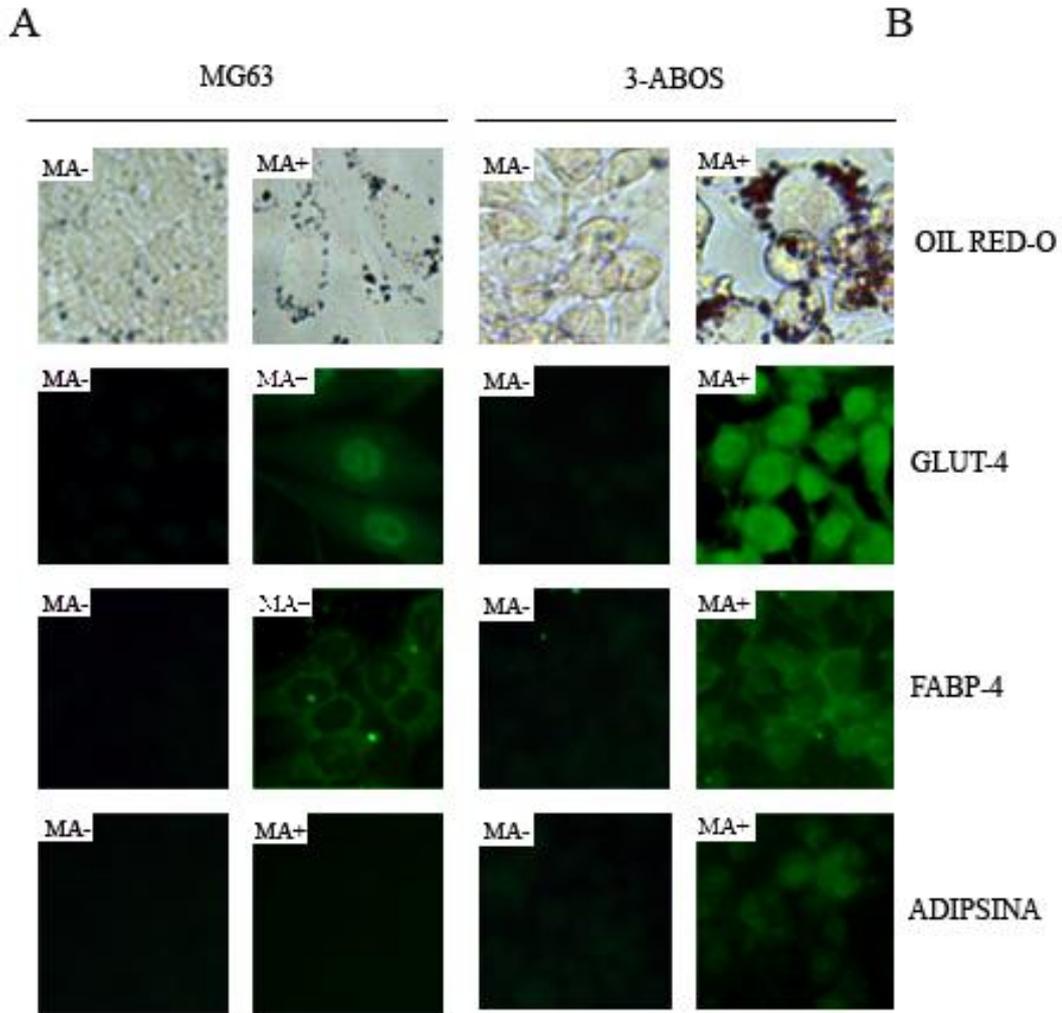


Fig. 9 - Analisi dei markers del differenziamento adipogenico. Le cellule MG-63 e 3AB-OS sono state trattate con sostanze differenzianti per un periodo di tre settimane, al termine delle quali, sia le cellule controllo, coltivate con semplice terreno di coltura senza supplementi differenziativi, che le cellule trattate, sono state sottoposte a colorazione Oil Red O, specifica per i lipidi neutri, e ad analisi di immunofluorescenza per la valutazione della GLUT-4 (glucose transporter-4), della FABP-4 (fatty acid-binding protein-4) e dell'adipsina. Nel pannello B sono riportate le analisi condotte nelle cellule 3AB-OS. In alto a destra sono mostrate le cellule in condizioni adipogeniche, nelle quali è possibile osservare, dopo colorazione Oil Red O, la presenza di depositi lipidici di varie dimensioni. Nei pannelli inferiori sono riportate le analisi di immunofluorescenza per la GLUT-4, FABP-4 e adipsina, rispettivamente. Nelle cellule indotte al differenziamento (pannelli di destra), si osserva un incremento della fluorescenza per tali proteine rispetto alle cellule non differenziate (pannelli di sinistra). Nel pannello A sono riportati i risultati relativi alla valutazione dei medesimi markers nelle cellule MG-63. Le cellule indotte al differenziamento (pannelli di destra), mostrano pochi vacuoli lipidici ed incrementi della fluorescenza appena apprezzabile per la GLUT-4 e la FABP-4 rispetto alle cellule non differenziate, e nessuna fluorescenza per l'adipsina. Ogni pannello è la rappresentazione singola di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento originale 400X.

DIFFERENZIAMENTO EPATOGENICO

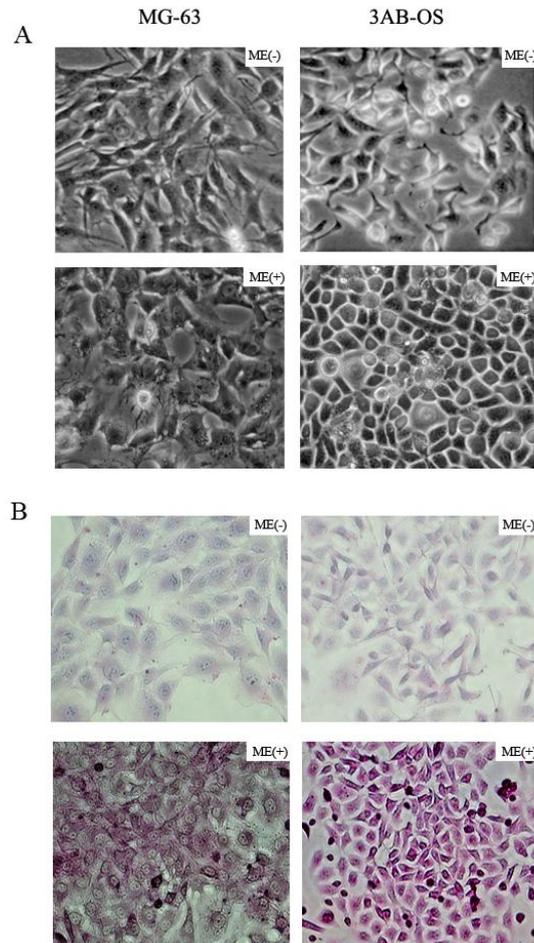


Fig. 10 – Cambiamenti della morfologia cellulare e capacità di immagazzinare glicogeno durante il differenziamento epatico delle cellule MG-63 e 3AB-OS. Nel pannello A, sono riportate le osservazioni morfologiche per le cellule MG-63 (colonna sinistra) e 3AB-OS (colonna destra). Le cellule 3AB-OS, in condizioni epatogeniche (colonna destra, in basso) acquisiscono una morfologia ovale e cuboidale. Le cellule MG-63, in presenza degli agenti differenzianti (colonna sinistra, in basso), perdono la morfologia bipolare fibroblastica ma non acquisiscono alcuna delle morfologie descritte per le 3AB-OS, nelle medesime condizioni.

Per valutare la capacità delle cellule differenziate di sintetizzare glicogeno sono state condotte delle analisi tramite la colorazione PAS. Nel pannello B, le cellule 3AB-OS, indotte al differenziamento (colonna destra, in basso), mostrano un incremento consistente della colorazione PAS, rispetto alle cellule non differenziate (colonna destra, in alto), suggerendo un'elevata capacità ad immagazzinare glicogeno. Nelle cellule MG-63, indotte al differenziamento (colonna sinistra, in basso), è osservabile un leggero incremento di tale colorazione rispetto alle cellule non differenziate (colonna sinistra, in alto). Ogni pannello è la rappresentazione singola di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento originale 100X.

VALUTAZIONE DEI MARKERS EPATICI

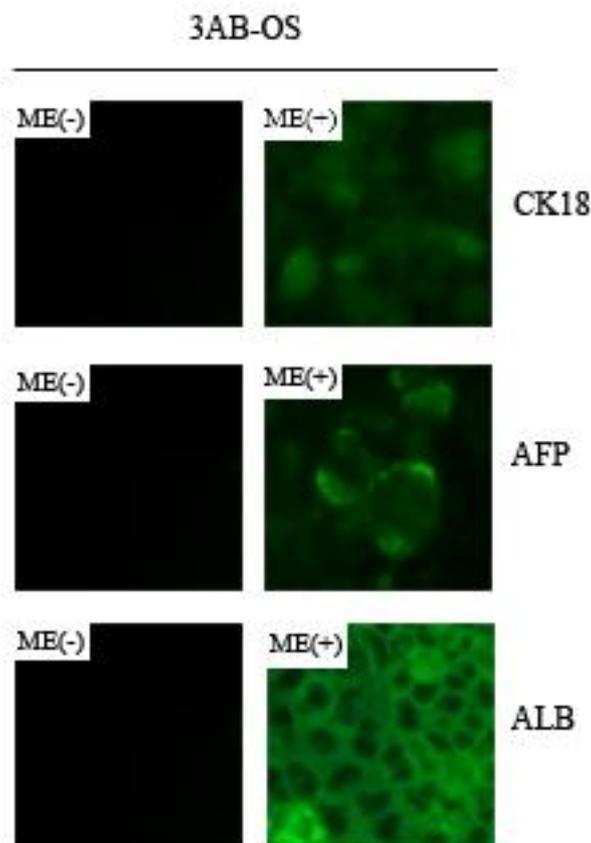


Fig. 11 – Analisi dei markers del differenziamento epatogenico. Per il differenziamento epatogenico le cellule, MG-63 e 3AB-OS, sono state trattate per un periodo di venti giorni con sostanze differenzianti, come descritto nella sezione materiali e metodi. Al termine del periodo di differenziamento nelle cellule sottoposte a differenziamento e nelle cellule non differenziate sono state condotte analisi di immunofluorescenza per la valutazione della citocheratina 18 (CK18), della α -fetoproteina (AFP) e dell'albumina (ALB). In figura sono riportate le analisi di immunofluorescenza, condotte nelle cellule 3AB-OS, per la valutazione di tali proteine. Come è visibile, nelle cellule in condizioni epatogeniche (colonna destra) è osservabile una notevole fluorescenza per tali antigeni, mentre nelle cellule non differenziate non è rilevata alcuna fluorescenza (colonna sinistra). Ogni pannello è la rappresentazione singola di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento originale 400X.

DIFFERENZIAMENTO NEUROGENICO

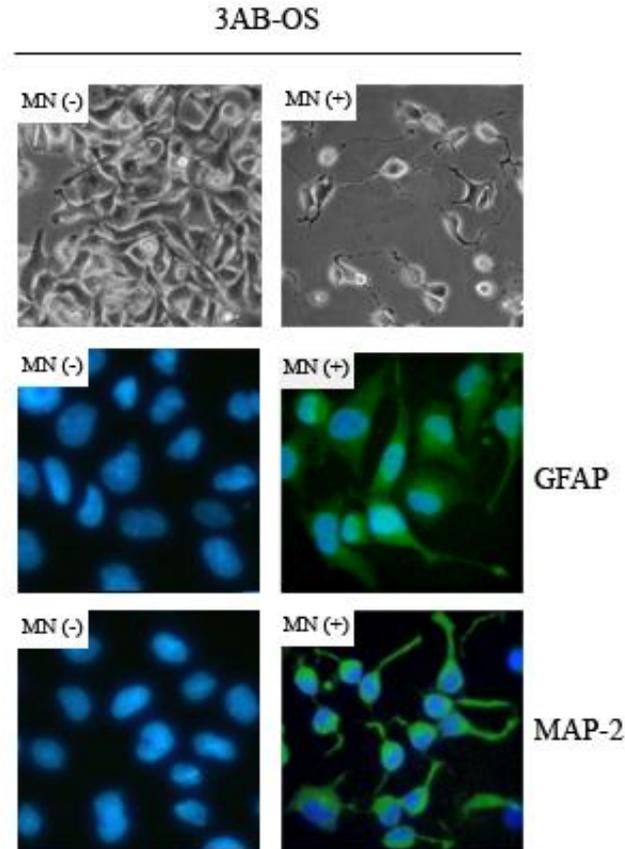


Fig. 12 - **Differenziamento neurogenico.** Per il differenziamento neurogenico le cellule, MG-63 e 3AB-OS, sono state trattate per un periodo di dieci giorni con agenti differenzianti, come descritto nella sezione materiali e metodi. Al termine del periodo di differenziamento, nelle cellule sottoposte a differenziamento e nelle cellule non differenziate, sono stati valutati i cambiamenti morfologici e l'espressione della GFAP (Glial fibrillary acid protein) e della MAP-2 (microtubule associated protein-2), considerati markers neurogliali. Come è osservabile, in condizioni neurogeniche (in alto a destra), le cellule 3AB-OS acquisiscono una morfologia tipica delle cellule neurogliali, rappresentata da un corpo cellulare rifrangente e da processi lunghi e sottili, simile a quella dei neuroni, oppure, da elementi cellulari che presentano un corpo cellulare largo e processi sottili caratteristici degli astrociti (ingrandimento originale 200X). Inoltre, le analisi di immunofluorescenza per la valutazione dei markers neurogliali quali GFAP (pannelli centrali) e MAP-2 (pannelli in basso), mostrano che le cellule 3AB-OS, in condizioni neurogeniche (colonna destra), esprimono in maniera consistente entrambi i markers neurogliali (ingrandimento originale 400X). Nella colonna sinistra sono mostrate le cellule non differenziate. Ogni pannello è la rappresentazione singola di tre esperimenti indipendenti.

STUDIO DEL POTENZIALE INVASIVO *IN VITRO* E DEL POTENZIALE TUMORIGENICO *IN VIVO*.

Per caratterizzare come “staminale tumorale” una cellula, altri due requisiti fondamentali sono: dimostrare la capacità migratoria e la potenzialità tumorigenica (Graziano et al., 2008). Pertanto, ho condotto alcuni studi per valutare se le cellule 3AB-OS possedessero tali caratteristiche. Gli studi sono stati condotti comparativamente con le cellule MG-63.

Potenziale di invasività in vitro. La capacità migratoria delle cellule MG63 e 3AB-OS è stata valutata tramite il saggio di invasività in matrigel, come descritto nella sezione materiali e metodi. L’invasione attraverso il matrigel mima il processo patologico che si sviluppa in tre tappe: 1) adesione al substrato; 2) dissoluzione della matrice extracellulare; 3) migrazione (Albini et al., 1998). In figura 13 sono mostrati i risultati di questi studi. Come si può osservare, le cellule 3AB-OS mostrano una capacità di invadere il matrigel, espressa come numero di cellule migrate per campo, molto più elevata rispetto a quella manifestata dalle cellule MG-63 ($p < 0.005$).

Potenziale tumorigenico in vivo. Per valutare la capacità delle cellule MG-63 e delle 3AB-OS di proliferare e di generare tumori sono stati condotti studi di xenotrapianti in collaborazione con il Prof. Ocker (Dipartimento di Medicina I, Università di Erlangen, Germania). Lo sviluppo di questi studi è stato seguito dal Dott. Pietro Di Fazio, assegnista della Prof. Vento, che stava sviluppando un periodo di stage in quei laboratori. Brevemente, le cellule MG-63 e 3AB-OS sono state inoculate sottocute in topi NMRI (topi nudi atimici); cinque animali sono stati utilizzati per ogni gruppo di trattamento, come descritto nella sezione materiali e metodi. La crescita dei tumori è stata monitorata giornalmente tramite un calibro e dopo circa 48 giorni gli animali sono stati sacrificati. In figura 14 sono riportate le osservazioni macroscopiche relative al gruppo di topi (6-10) inoculati con le cellule 3AB-OS. L’inculo 6, prima che l’animale venisse sacrificato, mostrava una massa tumorale di 6.8 mm di diametro (dato non mostrato), indicando una crescita sottocutanea minima; in realtà, come mostra la figura, quando l’animale venne sacrificato si è osservata la presenza di

numerose metastasi epatiche (pannello sinistro) e peritoneali (pannello destro), rappresentando un fatto del tutto eccezionale per inoculi sottocutanei. Gli inoculi 7-10, quest'ultimo non mostrato, hanno generato tumori di grandi dimensioni (16-23 mm di diametro), altamente vascolarizzati, non infiltranti; ma il dato più interessante è l'assenza di necrosi centrale.

In figura 15, pannello A, sono mostrate le osservazioni macroscopiche relative al gruppo di topi inoculati con le cellule MG-63. Come si può osservare, solamente gli inoculi nei topi 1 e 2 hanno determinato la comparsa di una massa tumorale sottocutanea le cui dimensioni, inferiori a 7.4 mm di diametro, non sono assolutamente paragonabili a quelle osservate per gli inoculi con cellule 3AB-OS. Nel pannello B è riportata la curva di crescita tumorale, espressa come valore medio del diametro del tumore in funzione del tempo. Come è osservabile, i tumori sviluppatasi dall'inoculo di cellule 3AB-OS aumentano costantemente di dimensione e con una certa rapidità, fenomeno che non si manifesta negli inoculi di cellule MG-63. Questi dati dimostrano che le cellule 3AB-OS posseggono, rispetto alle MG-63, proprietà clonogeniche che consentono loro di proliferare in un sistema in vivo probabilmente inducendo un ricca rete vascolare ed invadere l'organismo ospite dove è possibile riscontrare la formazione di metastasi peritoneali ed epatiche. Gli inoculi confermano inoltre che le cellule MG-63 non sono clonogeniche in vivo data l'incapacità di formare una massa tumorale. Attualmente, sono in corso indagini istologiche per meglio definire le caratteristiche fenotipiche e molecolari di questi tumori indotti.

POTENZIALE DI INVASIVITÀ IN VITRO

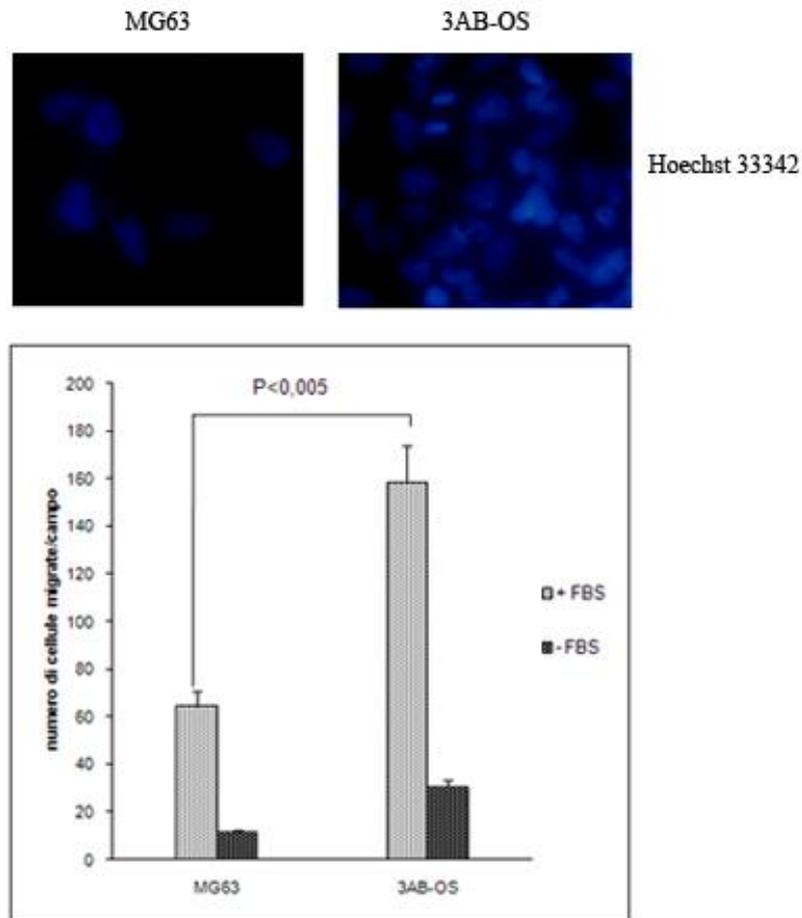


Fig. 13 – Analisi del potenziale invasivo in vitro. La capacità migratoria delle cellule MG63 e 3AB-OS è stata valutata tramite il saggio di invasività in matrigel. Nei pannelli in alto, sono mostrate le cellule MG-63 (a sinistra) e 3AB-OS (a destra) migrate attraverso il matrigel dopo colorazione con Hoechst 33342. Il numero di cellule migrate in ogni membrana è stato determinato contando cinque campi con ingrandimento 400 X. Le cellule 3AB-OS mostrano una capacità di invadere il matrigel, espressa come numero di cellule migrate per campo, molto più elevata rispetto a quella manifestata dalle cellule MG-63. I dati sono rappresentati come la media \pm DS di tre esperimenti differenti con una significatività statistica di * $p < 0.005$.

STUDI DI TUMORIGENICITA' IN VIVO

3AB-OS

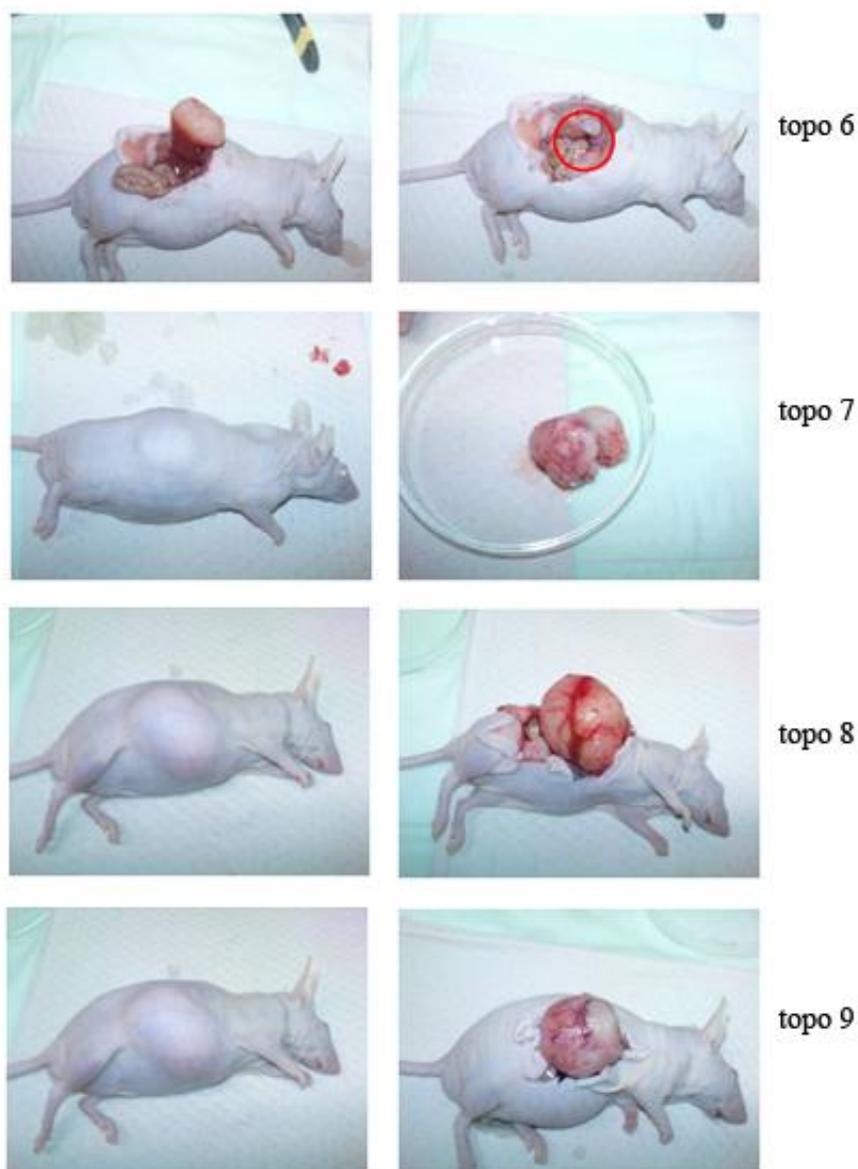
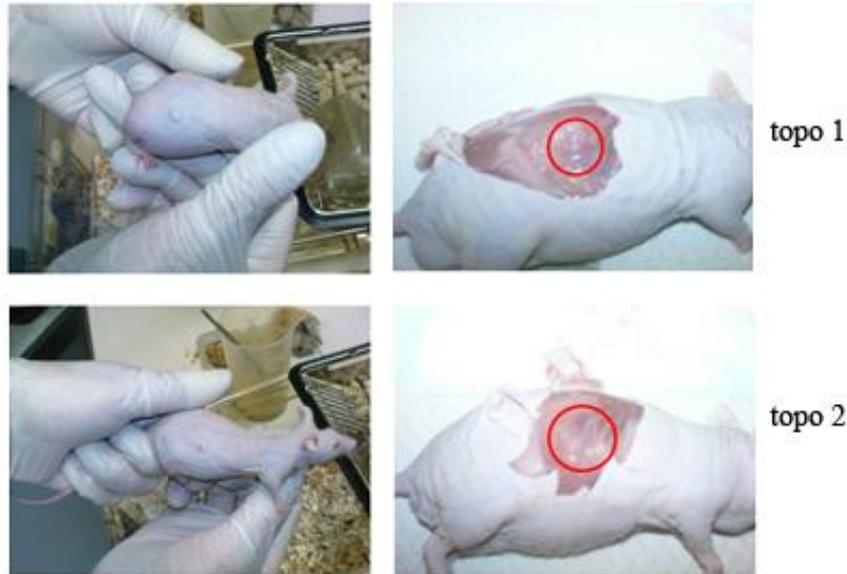


Fig. 14 – Valutazione della tumorigenicità in vivo delle cellule 3AB-OS. Le cellule sono state inoculate sottocute in topi NMRI (topi nudi atimici) maschi di 6-8 settimane di età. La crescita dei tumori è stata monitorata giornalmente tramite un calibro e dopo circa 48 giorni gli animali sono stati sacrificati. In figura sono riportate le osservazioni macroscopiche relativi al gruppo di topi (6-10) inoculati con le cellule 3AB-OS. L'inculo 6 mostra la presenza di numerose metastasi epatiche (pannello sinistro) e peritoneali (pannello destro); gli inoculi 7-10, quest'ultimo non mostrato, hanno generato tumori di grandi dimensioni (16-23 mm di diametro), altamente vascolarizzati, non infiltranti; ma il dato più interessante è l'assenza di necrosi centrale.

A

MG63



B

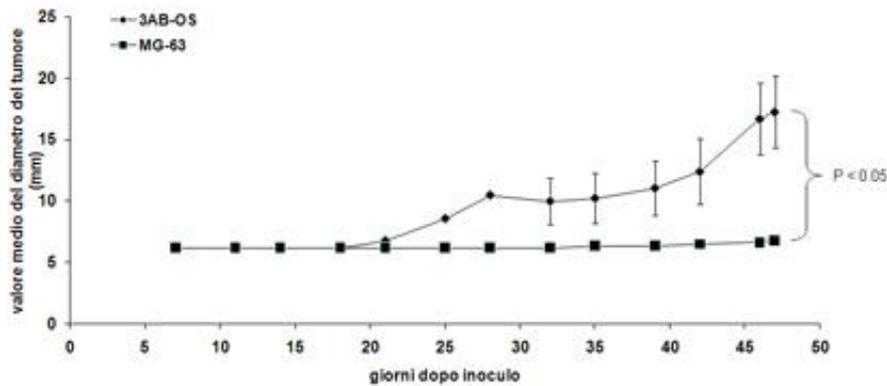


Fig. 15 – Valutazione della tumorigenicità in vivo delle cellule di osteosarcoma umano MG-63. Le cellule sono state inoculate sottocute in topi NMRI (topi nudi atimici) maschi di 6-8 settimane di età. La crescita dei tumori è stata monitorata giornalmente tramite un calibro e dopo circa 48 giorni gli animali sono stati sacrificati. Nel pannello A, sono riportate le osservazioni macroscopiche relative al gruppo di inoculi 1 e 2, gli unici che hanno determinato la comparsa di una massa tumorale sottocutanea di dimensioni inferiori a 7.4 mm di diametro. Nel pannello B è riportata la curva di crescita tumorale, espressa come valore medio del diametro del tumore in funzione del tempo.

DISCUSSIONE

Oggi si ritiene che all'interno di una massa tumorale esisterebbe una sub-popolazione cellulare con caratteristiche staminali in grado di autorigenerarsi (self-renew), di proliferare e di differenziare per dare origine alla complessa ed eterogenea popolazione tumorale. Pertanto, la possibilità di identificare nei tumori cellule staminali tumorigeniche può facilitare la comprensione dei meccanismi che regolano la loro crescita, sopravvivenza ed espansione consentendo l'individuazione di trattamenti specificatamente diretti verso tali bersagli cellulari. L'identificazione di tali cellule all'interno di ogni tipo di tumore rimane uno dei problemi principali per la ricerca sul cancro. I dati riportati in questa tesi dimostrano che il trattamento prolungato con 3-aminobenzamide nelle cellule di osteosarcoma umano MG-63 ha selezionato irreversibilmente un fenotipo cellulare stem-like che esprime numerosi markers embrionali e mesenchimali. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono cellule progenitrici multipotenti, in grado di autorigenerarsi e differenziarsi in diversi tipi cellulari come le cellule dell'osso, della cartilagine, dei tendini e del tessuto muscolare. Queste cellule, come dimostrato, sono in grado di transdifferenziare in vitro in altri tipi cellulari, indicando una staminalità tipica delle cellule pluripotenti (Reger et al., 2008). Studi recenti hanno dimostrato che le cellule staminali mesenchimali possono essere selezionate sulla base di antigeni di superficie come CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, STRO-1 ed altri (Park et al., 2007; Nadri et al., 2008).

L'osteosarcoma è tra le il gruppo delle malignità mesenchimali, quello che presenta eterogeneità clinica, istologica e molecolare e, pertanto, la biologia della sarcomogenesi è ancora poco chiara (Tang et al., 2008). Studi condotti in precedenza, nei laboratori dove ho sviluppato il mio progetto di ricerca, hanno dimostrato che il trattamento per 24-96h con 3-AB induce, nelle cellule di osteosarcoma umano MG-63, il differenziamento morfologico e biomolecolare in osteociti. Gli studi da me condotti hanno dimostrato che il prolungamento del trattamento con 3-AB nelle cellule di osteosarcoma umano MG-63, induce un progressivo e massivo processo di morte delle cellule MG-63 differenziate che vengono sostituite da una nuova popolazione cellulare. Ciò ha suggerito che tale trattamento possa favorire la selezione e

l'espansione di una nuova popolazione cellulare. I miei studi hanno dimostrato che tale popolazione esprime numerosi markers legati alla staminalità embrionale e mesenchimale. Queste cellule rappresentano una popolazione cellulare stabile che, dopo una serie di passaggi seriali (circa 73, ossia 20 mesi), ha mantenuto le medesime caratteristiche anche in assenza di 3-AB. Infatti, queste cellule ancora oggi sono tenute in coltura, nei laboratori dove tuttora svolgo la mia attività di ricerca, in assenza di 3-AB. La capacità da parte delle cellule staminali cancerose di escludere molecole lipofiliche, come i coloranti fluorescenti rodamina 123 e Hoechst 33342, dipendenti dalla presenza dei trasportatori ABC (ATP-Binding Cassette), attualmente viene sfruttata per l'identificazione di una popolazione cellulare arricchita in cellule primitive ed indifferenziate in numerose malattie tumorali (Challen and Little, 2006). La presenza di cellule resistenti ai trattamenti farmacologici rimane uno dei principali problemi per il trattamento dei tumori. Numerosi dati clinici rivelano che il fenotipo MDR (Multi-drug resistance) dei tumori è correlato principalmente con l'overespressione dei trasportatori ABC (ATP-binding cassette) (Bunting, 2002). La P-glycoprotein (Pgp/ABCB1/MDR1) è stata la prima ad essere scoperta e probabilmente la più conosciuta per la sua relazione con la resistenza delle cellule tumorali (Ieiri et al., 2004). Altri due trasportatori responsabili della resistenza dei tumori ai chemioterapici sono: la multidrug resistance associated protein 1 (MRP1/ABCC1) e la mitoxantrone resistance protein (MXR/BCRP/ABCG2) (Bart et al., 2004; Choi, 2005). Gli studi riportati in questa tesi mostrano che le cellule 3AB-OS sono capaci di escludere lo Hoechst 33342 in maniera più efficace delle MG-63, mentre non sono capaci di escludere la rodamina 123. Inoltre, le cellule 3AB-OS mostrano elevati livelli di espressione di ABCG2 e non esprimono ABCB1, mentre le MG-63 mostrano una forte espressione di ABCB1, confermato anche dall'inibizione indotta dal verapamil, ed una bassa espressione di ABCG2. Diversi studi riportano che l'espressione di ABCG2 è riscontrata in numerosi tumori (leucemia, tumore della mammella, della prostata e del polmone) e viene interpretata come una caratteristica conservata delle cellule staminali (Abbott 2003; Doyle and La Ross, 2003; Kawabata et al., 2003; Hoei-Hansen et al., 2006).

Oltre che per la valutazione dell'espressione del fenotipo MDR, le cellule 3AB-OS e MG-63 sono state comparate in tutti i seguenti studi: formazione delle sfere (saggio di clonogenicità in vitro); analisi delle dimensioni cellulari; espressione dei geni correlati col ciclo cellulare, col mantenimento della staminalità e dell'inibizione dell'apoptosi; espressione dei markers di superficie; valutazione del potenziale proliferativo e dello stato di "commitment"; valutazione del potenziale differenziativo ed invasivo in vitro; valutazione del potenziale tumorigenico in vivo.

Il saggio delle sarcosfere rappresenta un sistema di coltura per valutare la capacità di autorigenerarsi delle cellule, una prerogativa delle cellule staminali (Clark et al., 2006). Le cellule 3AB-OS, rispetto alle MG-63, formano sfere con una frequenza maggiore e posseggono un tasso proliferativo più elevato; inoltre, le cellule 3AB-OS possono essere mantenute in coltura in maniera illimitata senza alcuna variazione significativa del tasso proliferativo, mentre le MG-63 possono essere tenute in coltura per un tempo limitato. Questa caratteristica è supportata dai risultati che mostrano come le cellule 3AB-OS, rispetto alle MG-63, esprimono elevati livelli di hTERT, subunità catalitica della telomerasi, nota per essere correlata con la capacità proliferativa illimitata delle cellule tumorali (Burns et al., 2005).

Rispetto alle cellule MG-63, le 3AB-OS mostrano un ciclo cellulare più breve, dimensioni minori, livelli più elevati della proteina Rb iperfosforilata (forma inattiva), accompagnata da livelli più elevati della ciclina D1, ciclina E ed E2F1 che contribuiscono alla transizione G1/S; esse presentano, anche, livelli più elevati della ciclina A e B1, che assieme ai livelli elevati della chinasi cdc2 inducono l'entrata delle cellule in mitosi (Deshpande et al., 2005; Stark and Taylor, 2006); inoltre, le cellule 3AB-OS mostrano livelli più elevati di β -catenina nucleare che, oltre a controllare l'espressione della ciclina D1, insieme a CD29 è coinvolta nella regolazione della proliferazione delle cellule staminali pluripotenti con meccanismi integrina-dipendenti (Hoang et al., 2004; Hartmann, 2006; Chiba et al., 2007); in aggiunta, le cellule 3AB-OS risultano meno "committed" al differenziamento osteogenico rispetto alle MG-63, mostrando livelli più bassi di ROR2, FAK, RUNX2, Osterix e ALP markers del

differenziamento osteogenico (Liu et al., 2007, Salaszyk et al., 2007) e risultano, anche, meno “committed” in senso adipogenico, mostrando livelli inferiori di PPAR γ , markers del differenziamento adipogenico (Lin et al., 2007; Yanagisawa et al., 2007).

Riguardo l’espressione dei geni richiesti per il mantenimento della staminalità, le cellule 3AB-OS risultano, in maniera simile alle MG-63, fortemente positive per CD44 e CD90, più positive per CD29 (markers staminali mesenchimali); inoltre, le cellule 3AB-OS mostrano una potente positività per CD133 (>88%), marker delle cellule staminali pluripotenti (Shmelkov et al., 2005; Neuzil et al., 2007), esprimono elevati livelli di oct-3/4, nanog e nucleostemina, markers caratteristici delle cellule embrionali e delle cellule germinali primordiali (Ye et al., 2008) che sono necessari per il mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali embrionali (Darr et al., 2006). Nelle cellule MG-63 CD133 risulta immisurabile, inoltre tali cellule risultano poco positive per oct-3/4, nanog e nucleostemina.

E’ noto che tra i segnali che influenzano la divisione, il differenziamento e la funzione delle cellule staminali, la disponibilità di ossigeno gioca un ruolo chiave e, in particolare, i fattori HIFs (hypoxia-inducible factors) possono regolare la funzione della cellula staminale attraverso l’attivazione di numerosi geni che contribuiscono alla sopravvivenza (Simon and Keith, 2008). I risultati riportati in questa tesi mostrano che le cellule 3AB-OS esprimono elevati livelli di HIF-1 α , molecola chiave per la sopravvivenza della cellula staminale e ben correlata con i livelli elevati di oct-3/4 e nanog, mentre nelle cellule MG-63 i livelli sono immisurabili.

Sebbene l’espressione dei trasportatori ABC rappresenti uno dei principali meccanismi di resistenza ai chemioterapici antitumorali, difetti nei meccanismi che controllano la morte cellulare contribuiscono sicuramente in misura eguale o addirittura maggiore. I risultati ottenuti dimostrano che le cellule 3AB-OS, rispetto alle MG-63, presentano livelli più elevati di fattori antiapoptotici (Bcl-2, FlipL, XIAP, IAP-1, IAP-2 e survivina) che possono rappresentare caratteristiche aggiuntive delle cellule staminali tumorali.

Per caratterizzare come “staminale” una linea cellulare, un requisito fondamentale è dimostrare le potenzialità differenziative, ossia la capacità di dare origine a diversi tipi cellulari. Gli studi riportati in questa tesi hanno dimostrato che le cellule 3AB-OS, coltivate in condizioni osteogeniche, mostrano un’ elevata attività della fosfatasi alcalina ed un incremento consistente della positività per l’osteocalcina, mentre, le cellule MG-63 , nelle medesime condizioni, mostrano una minore positività per tali markers osteogenici.

In condizioni adipogeniche, le cellule 3AB-OS mostrano diversi depositi di lipidi neutri di varie dimensioni, caratteristici degli adipociti multivacuolari e incrementi consistenti della positività per i markers adipogenici quali GLUT-4, FABP-4 e adipina. Le cellule MG-63, nelle medesime condizioni, mostrano una minore positività per tali markers.

In condizioni epatogeniche le cellule 3AB-OS acquisiscono una morfologia ovale e cuboidale, inoltre, mostrano un incremento consistente della fluorescenza per i markers epatici come CK18 (citocheratina 18), AFP (α -fetoproteina) e ALB (albumina). Gli studi, tramite colorazione PAS, hanno dimostrato che le cellule 3AB-OS, indotte al differenziamento, mostrano un’elevata capacità di immagazzinare glicogeno. Questo dato insieme a quello dell’albumina dimostrano l’acquisizione di caratteristiche funzionali da parte delle cellule differenziate. Gli studi, condotti sulle MG-63, hanno dimostrato che queste non sono capaci di differenziare in senso epatogenico.

In condizioni neurogeniche le cellule 3AB-OS acquisiscono una morfologia ed esprimono geni specifici delle cellule neurogliali come MAP-2 e GFAP, valutati tramite analisi di immunofluorescenza. Gli studi, condotti sulle MG-63, hanno dimostrato che queste non sono capaci di differenziare in senso neurogenico.

Questi studi dimostrano che le cellule 3AB-OS sono in grado di differenziarsi, in vitro, in tipi cellulari derivanti dal mesoderma, dall’endoderma e dall’ectoderma, suggerendo un grado di staminalità simile a quelle delle cellule pluripotenti, mentre le cellule MG-

63 mostrano un leggero potenziale differenziativo solamente in senso osteogenico ed adipogenico.

Altri due importanti requisiti necessari per definire una cellula staminale cancerosa sono: elevata capacità migratoria ed elevato potenziale tumorigenico (Graziano et al., 2008). Gli studi, relativi al potenziale invasivo, hanno dimostrato che le cellule 3AB-OS, rispetto alle MG-63, mostrano una maggiore capacità di invadere il matrigel. Per valutare il potenziale tumorigenico, oltre al saggio in vitro delle sfere, sono stati condotti degli studi in vivo, utilizzando topi NMRI (topi nudi atimici) come modello sperimentale. Questi studi hanno dimostrato che le cellule 3AB-OS possiedono, rispetto alle MG-63, proprietà clonogeniche che consentono loro di proliferare in un sistema in vivo e di invadere l'organismo ospite, dimostrato dalla formazione di tumori sottocutanei e dalle metastasi peritoneali ed epatiche. Questi studi, inoltre, confermano che le cellule MG-63 sono scarsamente clonogeniche in vivo.

I dati riportati in questa tesi suggeriscono che le cellule MG-63 contengono una rara popolazione di cellule staminali cancerose, che possono essere selezionate ed arricchite col trattamento prolungato con 3AB, che produce una popolazione cellulare stabile (3AB-OS) caratterizzata da elevati livelli di CD133, ABCG2, nucleostemina, oct3/4, nanog, hTERT, regolatori del ciclo cellulare, fattori antiapoptotici e da altri numerosi caratteri di staminalità quali: autorigenerazione, elevata capacità migratoria, elevato potenziale proliferativo e differenziativo. I meccanismi attraverso i quali il trattamento con 3AB favorisce la selezione e l'arricchimento di queste cellule staminali devono ancora essere chiariti e saranno investigati in futuro. E' possibile che il trattamento prolungato uccida la maggioranza delle cellule MG-63, mentre la rara popolazione CD133⁺ riesca a sopravvivere; oppure è possibile che tale trattamento determini cambiamenti epigenetici responsabili dell'origine di tali cellule. Quest'ultima ipotesi è in accordo con l'evidenza secondo la quale l'osteosarcoma possa avere origine da un'interruzione del differenziamento osteoblastico delle cellule staminali mesenchimali attraverso cambiamenti genetici ed epigenetici (Tang et al.,

2008). Le cellule 3AB-OS possono rappresentare una nuova linea cellulare tumorale utile per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base delle cellule staminali tumorali e per l'individuazione di trattamenti specificatamente diretti verso tali bersagli cellulari. Con tali prospettive queste cellule sono state brevettate (Renza Vento, Riccardo Di Fiore FI2008A000238, Firenze, 11/12/2008).

BIBLIOGRAFIA

- Abbott BL. 2003. ABCG2 (BCRP) expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hematol Oncol* 21: 115-130.
- Ahmed F, Arseni N, Glimm H, Hiddemann W, Buske C, Feuring-Buske M. 2008. Constitutive expression of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 enhances the growth potential of early human hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 26(3): 810-818.
- Albini A. 1998. Tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. The matrigel chemoinvasion assay as a tool for dissecting molecular mechanisms. *Pathol Oncol Res*. 4(3): 230-241. Review.
- Al-Hajj M, Clarke FM. 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 23: 7274–7282.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 100(7): 3983-3988.
- Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF. 2004. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 14(1):43-47.
- Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA. 2002. An introduction to stem cells. *J Pathol*. 197: 419-423.
- Ambudkar SV, Kimchi-Sarfay C, Sauna ZE, Gottesman MM. 2003. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22: 7468-7485.
- Baguley BC. 2006. Tumor stem cell niches: a new functional framework for the action of anticancer drugs. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 1(1):121-127.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmelad AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756–760.
- Bart J, Hollema H, Groen HJ, de Vries EG, Hendrikse NH, Sleijfer DT, Wegman TD, Vaalburg W, van der Graaf WT. 2004. The distribution of drug-efflux pumps, P-gp,

BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood–testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur J Cancer* 40: 2064–2070.

Belicchi M, Pisati F, Lopa R, Porretti L, Fortunato F, Sironi M, et al. (2004). Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *Journal of Neuroscience Research*, 77(4): 475–486.

Belpomme D, Gauthier S, Pujade-Lauraine E, Facchini T, Goudier MJ, Krakowski I, Netter-Pinon G, Frenay M, Gousset C, Marie FN, Benmiloud M, Sturtz F. 2000 Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann Oncol* 11: 1471-1476.

Bielack SS, Marina N, Ferrari S, Helman LJ, Smeland S, Whelan JS, Reaman GH. 2008. Osteosarcoma: the same old drugs or more?. *J Clin Oncol* 26(18):3101-3103

Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJA. 2005. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* 5: 899-904.

Bonnet D, Dick JE. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730–737.

Bunting KD. 2002. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 20: 11-20.

Burkert J, Wright NA, Alison MR. 2006. Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J Pathol* 209: 287-297.

Burns JS, Abdallah BM, Guldberg P, Rygaard J, Schrøder HD, Kassem M. 2005. Tumorigenic Heterogeneity in Cancer Stem Cells Evolved from Long-term Cultures of Telomerase-Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Res* 65(8): 3126-3135.

Challen GA, Little MH. 2006. A side order of stem cells: The Sp phenotype. *Stem Cells* 24: 3–12.

Chiba T, Zheng YW, Kita K, Yokosuka O, Saisho H, Onodera M, Miyoshi H, Nakano M, Zen Y, Nakanuma Y, Nakauchi H, Iwama A, Taniguchi H. 2007. Enhanced self-

renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology* 133(3): 937-950.

Choi CH. 2005. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International* 2005, 5: 30

Christel D, Taranger K, Noer A, Sørensen AL, Hakelien A, Boquest AC, Collas P. 2005. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 16: 5719–5735.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM: 2006. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339-9344.

Clevers H. 2005. Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nature Genet* 37: 1027–1028.

Collins AT, P.A. Berry PA, C. Hyde C, M.J. Stower MJ, Maitland NJ. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, *Cancer Res.* 65: 10946–10951.

Collins CA, Olsen I, Zammit P.S., Heslop L., Petrie A., Partrig T.A., Morgan, J.E. 2005. Stem cell function, self renewal, and behavioural heterogeneity of cells from the germ line to the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122: 289-301.

Consoli U, Priebe W, Ling YH, Mahadevia R, Griffin M, Zhao S, Perez-Soler R, Andreeff M: 1996. The novel anthracycline annamycin is not affected by P-glycoprotein-related multidrug resistance: comparison with idarubicin and doxorubicin in HL-60 leukemia cell lines. *Blood* 88: 633-644.

Corbeil D, Roper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB. 2001. Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic* 2(2): 82–91.

Crowe DL, Parsa B, Sinha UK. Relationships between stem cells and cancer stem cells. *Histol Histopathol* (2004); 19: 505–509.

- Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. 2007. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu. Rev. Med.* 58: 267–284.
- Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. 2006. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 133: 1193-1201.
- Dean M, Fojo T, Bates S. 2005. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* 5: 275-284.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G: 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42: 1007-1017.
- De Blasio A, Messina C, Santulli A, Mangano V, Di Leonardo E, D'Anneo A, Tesoriere G, Vento R. 2005. Differentiative pathway activated by 3-aminobenzamide, an inhibitor of PARP, in human osteosarcoma MG-63 cells. *FEBS Letters* 579: 615-620.
- De Blasio A, Musmeci MT, Giuliano M, Lauricella M, Emanuele S, D'Anneo A, Vassallo B, Tesoriere G, Vento R. 2003. The effect of 3-aminobenzamide, inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase, on human osteosarcoma cells. *Int. Jour. Canc* 23: 1521-1528.
- De Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. 2006. Cell Size Correlates with Phenotype and Proliferative Capacity in Human Corneal Epithelial Cells. *Stem Cells* 24: 368–375.
- Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. 2005. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24(17): 2909-2915.
- Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, Bressa B, Ozturk LM, L Baker SJ, Vogelstein B, Friend't SH. 1990. p53 Functions as a Cell Cycle Control Protein In Osteosarcomas. *Molecular and Cellular Biology*: 5772-5781
- Dontu G, Liu S, Wicha MS. 2005. Stem cells in mammary development and carcinogenesis: Implications for prevention and treatment. *Stem Cell Rev* 1: 207–213.

- Doyle LA, Ross DD. 2003. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22: 7340-7358.
- Drago Ferrante R, Santulli A, Di Fiore R, Giuliano M, Calvaruso G, Tesoriere G, Vento R. 2008. Low doses of paclitaxel potently induces apoptosis in human retinoblastoma Y79 cells by upregulating E2F1. *Int. J. Oncol.* 33: 677-687.
- Efferth T. 2001. The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. *Curr Mol Med* 1: 45-65.
- Emanuele S, Calvaruso G, Lauricella M, Giuliano M, Bellavia G, D'Anneo A, Vento R, Tesoriere G. 2002. Apoptosis induce in hepatoblastoma HepG2 cells by the proteasome inhibitor MG-132 is associated with hydrogen peroxide production, expression of Bcl-X_s and activation of caspase-3. *International Journal of Oncology* 21: 857-865.
- Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Sayegh MH, Sadee W, Frank MH. 2005. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 65 (2005) 4320–4333.
- Frank NY, Pendse SS, Lapchak PH, Margaryan A, Shlain D, Doeing C, Sayegh MH, Frank MH. 2003. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* 278: 47156–47165.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. 2004. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64(19): 7011-7021.
- Gibbs PC, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, Ghivizzani SC, Ignatova TN, Steindler DA. 2005. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7(11): 967–976.
- Gibbs PC, Weber K, Scarborough MT. 2002. Malignant bone tumors. *Instr Course Lect* 51: 413-428.

- Giuliano M, Lauricella M, Calvaruso G, Carabillò M, Emanuele S, Vento R, Tesoriere G. 1999. The apoptotic effects and synergistic interaction of sodium butyrate, MG-132 in human retinoblastoma Y-79 cells. *Cancer Research* 59: 5586-5595.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo, *J. Exp. Med.* 183: 1797–1806.
- Graziano A, D'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Rossi A, Pirozzi G. 2008. The stem cell hypothesis in head and neck cancer. *J Cell Biochem* 103: 408–412.
- Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. 2006. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Experimental Cell Research* 312: 3701-3710.
- Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP. 2004. SP. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab.* 5: 21-53.
- Hambardzumyan D, Squartro M, Holland EC. 2006. Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. *Cancer Cell.* 10: 454–456.
- Hao HN, Zhao J, Thomas RL, Parker GC, Lyman WD. 2003. Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes in vitro. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 12(1): 23–32.
- Hartmann C. 2006. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biology* 16(3): 151-159.
- Haussermann K, Benz B, Gekeler V, Schumacher K, Eichelbaum M. 1991. Effects of verapamil enantiomers and major metabolites on the cytotoxicity of vincristine and daunomycin in human lymphoma cell lines. *Eur J Clin Pharmacol* 40: 53-59.
- He X, Tsang TC, Pipes BL, Ablin RJ, Harris DT. 2005. A stem cell fusion model of carcinogenesis. *J Exp Ther Oncol* 5: 101–109.
- Herrera RE, Sah VP, Williams BO, MaKela TP, Weinberg RA, Jacks T. 1996. Altered Cell Cycle Kinetics, Gene Expression, and G1 Restriction Point Regulation in Rb-Deficient Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 16(5): 2402–2407.

Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Yang R, Nathan SS, Kolb EA, Mazza BA, Meyers PA, Gorlick R. 2004. Dickkopf 3 Inhibits Invasion and Motility of Saos-2 Osteosarcoma Cells by Modulating the Wnt- β -Catenin Pathway. *Cancer Res* 64: 2734–2739.

Hoei-Hansen CE, Sehested A, Juhler M, Lau YF, Skakkebaek NE, Laursen H, Rajpert-de Meyts E. 2006. New evidence for the origin of intracranial germ cell tumours from primordial germ cells: expression of pluripotency and cell differentiation markers. *J Pathol* 209: 25-33.

Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. 2004. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306: 1568–1571.

Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. 2007. Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multilineage Differentiation Potential. *Biology of Reproduction* 77: 577–588.

Kawabata S, Oka M, Soda H, Shiozawa K, Nakatomi K, Tsurutani J, Nakamura Y, Doi S, Kitazaki T, Sugahara K, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. 2003. Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer. *Clin Cancer Res* 9(8): 3052-3057.

Krtolica A. 2005. Stem cell: balancing aging and cancer. *The International J. of Biochemistry & Cell Biology*. 37: 935-941.

Laemmly U K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-681

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367: 645–648.

Lauricella M, Calvaruso G, Giuliano M, Carabillò M, Emanuele S, Vento R, Tesoriere G. 2000. Synergistic cytotoxic interaction between sodium butyrate, MG-132 and camptotecin in human retinoblastoma Y-79 cells. *Tumor Biol* 70: 337-348.

- Lauricella M, D'Anneo A, Giuliano M, Calvaruso G, Emanuele S, Vento R, Tesoriere G. 2003. Induction of apoptosis in osteosarcoma Saos-2 cells by the proteasome inhibitor MG-132 and protective effect of pRb. *Cell Death and Differentiation* 10: 930-932.
- Li L, Neaves WB. 2006. Normal Stem Cells and Cancer Stem Cells: The Niche Matters. *Cancer Res* 66(9): 4553-4557.
- Li L, Xie T. 2005. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 605-631.
- Lin TH, Yang RS, Tang CH, Lin CP, Fu WM. 2007. PPAR γ inhibits osteogenesis via the down-regulation of the expression of COX-2 and iNOS in rats. *Bone* 41: 562-574.
- Litman T, Brangi M, Hudson E, et al. 2000. The multidrug resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 113: 2011-2021.
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* 5: 67.
- Liu Y, Bhat RA, Seestaller-Wehr LM, Fukayama S, Mangine A, Moran RA, Komm BS, Bodine PV, Billiard J. 2007. The orphan receptor tyrosine kinase Ror2 promotes osteoblast differentiation and enhances ex vivo bone formation. *Mol Endocrinol* 21(2): 376-387.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Fan AL, Randall R J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Maitland NJ, Collins AT. 2008. Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol* 26(17): 2862-2870.
- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, et al. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61:3458-3464.

- Mao Q, Unadkat JD. 2005. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in Drug Transport. *The AAPS Journal* 7 (1) Article 12
- Marina N, Gerbhardt M, Teot L, Gorlick R. 2004. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist* 9: 422-441.
- Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Brauninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, et al. 2005. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci* 118: 2849–2858.
- Mauney JR, Vladimir Volloch V, David L. Kaplan DL. 2005. Matrix-mediated retention of adipogenic differentiation potential by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *Biomaterials* 26: 6167–6175.
- Maw M A, Corbeil D, Koch J, Hellwig A, Wilson-Wheeler JC, Bridges RJ, et al. 2000. A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *HumanMolecular Genetics* 9(1); 27–34.
- Mayhall EA, Paffett-Lugassy N, Zon LI. 2004. The clinical potential of stem cell. *Curr. Op. Ceel Biol* 16: 713-720.
- Mazel M, Clair P, Rousselle C, Vidal P, Scherrmann JM, Mathieu D, Temsamani J. 2001. Doxorubicin-peptide conjugates overcome multidrug resistance. *Anticancer Drugs* 12: 107-116.
- Meyers PA, Schwartz CL, Krailo M, Kleinerman ES, Betcher D, Bernstein ML, Conrad E, Ferguson W, Gebhardt M, Gorin AM, et al. 2005. Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J Clin Oncol* 23: 2004-2011.
- Mizrak D, Brittan M and MR Alison MR. 2008. CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 214: 3–9.
- Molofsky AV, Pardal R, Morrison J. 2004. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* 16: 700–707.

- Nadri S, Soleimani M, Kiani J, Atashi A, Izadpanah R. 2008. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human eye conjunctiva stromal cells. *Differentiation* 76: 223–231.
- Neuzil J, Stantic M, Zobalova R, Chladova J, Wang X, Prochazka L, Dong L, Andera L, Ralph SJ. 2007. Tumour-initiating cells vs. cancer ‘stem’ cells and CD133: What’s in the name? *Biochem Biophys Res Commun* 355: 855–859.
- O’Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445(7123): 106-110.
- Pan G, Thomson JA. 2007. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 17(1): 42-49.
- Park BW, Hah YS, Kim DR, Kim JR, Byun JH. 2007. Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *Arch Oral Biol* 52(10): 983-989.
- Park YB, Park MJ, Kimura K., Shimizu K., Lee SH., Yokota J. 2002. Alteration in the INK4a/ARF locus and their effects on the growth of human osteosarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 133(2): 105-111.
- Picci P. 2007. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis* 23: 2-6.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. 2005. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65:5506–5511.
- Reger RL, Tucker AH, Wolfe MR. 2008. Differentiation and characterization of human MSCs. *Methods Mol Biol* 449: 93-107.
- Reya, T, Morrison, SJ, Clarke, MF, and Weissman, IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M., Peschle C, De Maria R. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445: 111–115.

- Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. 2004. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *Journal of Cell Science* 117(16): 3539–3545.
- Robert JS. 2004. Model systems in stem cell biology. *BioEssays* 26: 1005–1012.
- Sell S. 2004. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 51: 1–28.
- Robey RW, Honjo Y, van de Laar A, et al. 2001. A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). *Biochim Biophys Acta* 1512: 171-182.
- Rocchi E, khodjakov A, Volk EL, et al. 2000. The product of ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 42-46.
- Roper K, Corbeil D, Huttner WB. 2000. Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nature Cell Biol* 2: 582–592.
- Salasznyk RM, Klees RF, Williams WA, Boskey A, Plopper GE. 2007. Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 313(1): 22-37.
- Salmaggi A, Boiardi A, Gelati M, Russo A, C. Calatozzolo C, E.Ciusani E, F.L. Sciacca FL, Ottolina A, Parati EA, La Porta C, Alessandri G, Marras C, Croci D, De Rossi M. 2006 Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia* 54: 850–860.
- Schreiber E, Matthias P, Muller M, Schaffner W. 1989. Rapid detection of DNA binding proteins with mini-extracts prepared from a small number of cells. *Nucl. Acid Res* 17: 6419-6424.
- Sell S. 2004. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 51: 1-28.
- Semenza GL. 2007. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discovery Today* 12: 853-859.

- Shinya Y. 2007. Strategies and New Development in the Generation of the of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1: 39-49.
- Shiratsuchi H, Nakashima T, Hirakawa N, Toh S, Nakagawa T, Saito T, Tsuneyoshi M, Komune S. 2007. β -Catenin nuclear accumulation in head and neck mucoepidermoid carcinoma: its role in cyclin D1 overexpression and tumor progression. *Head Neck* 29(6): 577-584.
- Shmelkov SV, Jun L, St.Clair R, McGarrigle D, Derderian CA, Usenko JK, et al. 2004. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood* 103(6): 2055–2061.
- Shmelkov SV, St.Clair R, Lyden D, Rafii S. 2005. Molecules in focus: AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 715–719.
- Simon MC, Keith B. 2008 The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 285-296.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Havkins C, Squire J, et al. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63(18): 5821-5828.
- Singh SK, Havkins C, Clarke ID, et al. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432(7015): 396-401.
- Skubitz KM, D'Adamo DR. 2007. Sarcoma. *Mayo Clin Proc* 82(11): 1409-1432
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature* 414:98–104.
- Stark GR, Taylor WR. 2006. Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol* 32(3): 227-248.
- Stavrovskaya AA: 2000. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)* 65: 95-106.
- Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. 2008. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res.* 466(9): 2114-2130.
- Teodori E, Dei S, Scapecchi S, Gualtieri F. 2002. The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs. *Farmaco* 57: 385-415.

Toffoli G, Simone F, Corona G, Raschack M, Cappelletto B, Gigante M, Boiocchi M. 1995. Structure-activity relationship of verapamil analogs and reversal of multidrug resistance. *Biochem Pharmacol* 1995, 50: 1245-1255.

Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D. 2004. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72: 319–326.

Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH. 2005. The role of human adult stem cells and cell-cell communication in cancer chemoprevention and chemotherapy strategies. *Mutat Res* 591(1-2): 187-97.

Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. 1981. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 41: 1967-1972.

Walkley CR, Qudsi R, Sankaran VG, Perry JA, Gostissa M, Roth SI, Rodda SJ, Snay E, Dunning P, Fahey FH, Alt FW, McMahon AP, Orkin SH. 2008. Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb. Mimics the human disease 22(12): 1662-1667.

Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. 1997. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(23): 12425–12430.

Wicha MS, Liu S, Dontu G. 2006. Cancer stem cells: An old idea—a paradigm shift. *Cancer Res* 66: 1883–1890.

Yanagisawa M, Suzuki N, Mitsui N, Koyama Y, Otsuka K, Shimizu N. 2007. Effects of compressive force on the differentiation of pluripotent mesenchymal cells. *Life Sciences* 81: 405–412.

Ye F, Zhou C, Cheng Q, Shen J, Chen H. 2008. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. *BMC Cancer*. 8: 108-113.

Yi L, Zhou ZH, Ping YF, Chen JH, Yao XH, Feng h, et al. 2007. Isolation and characterization of stem cell-like precursor cells from primary human anaplastic oligoastrocytoma. 2007. *Mod Pathol* 20: 1061-1068.

Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J. 2002. AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23): 20711–20716.

Zheng YB, Gao ZL, Xie C, Zhu HP, Peng L, Chen JH, Chong YT. 2008. Characterization and hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: A comparative study. *Cell Biology International* 32: 1439-1448.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP: 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side population phenotype. *Nat Med* 7:1028-1034.

Zou GM. 2008. Cancer initiating cells or cancer stem cells in the gastrointestinal tract and liver. *J. Cell. Physiol* 217(3): 598-604.

INDICE

Introduzione	pag 01
Cellule staminali tumorali	pag 02
CD133 (PROMININA-1): molecola utile per l'identificazione di cellule staminali	pag 11
Trasportatori ABC (ATP-Binding Cassette): Ruolo chiave nella resistenza ai chemioterapici e nell'identificazione di cellule staminali	pag 15
Osteosarcoma	pag 21
Obiettivo della ricerca	pag 25
Materiali e Metodi	pag 27
Condizioni di coltura delle cellule	pag 28
Osservazioni della morfologia cellulare	pag 29
Saggio delle sarcosfere	pag 29
Saggio di esclusione della rodamina 123	pag 29
Saggio di esclusione dello Hoechst 33342 ed espressione di ABCB1 e ABCG2	pag 30
Caratterizzazione fenotipica mediante analisi citofluorimetrica	pag 30
Analisi dei markers di staminalità tramite immunofluorescenza	pag 31
Analisi delle dimensioni cellulari tramite citofluorimetria	pag 32
Saggio di proliferazione cellulare	pag 32
Induzione del differenziamento osteogenico	pag 32

Saggio della fosfatasi alcalina	pag 33
Induzione del differenziamento adipogenico	pag 33
Colorazione “Oil-Red O” per valutare i depositi di lipidi neutri	pag 34
Induzione del differenziamento epatogenico	pag 34
Colorazione PAS (periodic acid-Schiff) per valutare l’accumulo di glicogeno	pag 35
Induzione del differenziamento neurogenico	pag 35
Analisi dei markers differenziativi tramite immunofluorescenza	pag 36
Analisi di invasività cellulare “in vitro”	pag 36
Analisi della crescita tumorale “in vivo”	pag 37
Analisi di Western blotting	pag 37
Tecnica di estrazione di proteine nucleari e citosoliche	pag 39
Analisi RT-PCR	pag 39
Risultati	pag 42
Produzione delle cellule 3AB-OS dalle cellule di osteosarcoma umano MG-63tramite trattamento prolungato con 3-AB	pag 43
Analisi del fenotipo “multidrug resistance” nelle cellule MG-63 e 3AB-OS tramite saggi di esclusione della rodamina 123 dello hoechst 33342 per microscopia a fluorescenza, citometria a flusso e RT-PCR	pag 46
Formazione di sfere nelle cellule MG-63 e 3AB-OS	pag 49
Caratterizzazione delle cellule 3AB-OS: potenziale proliferativo, dimensioni e regolatori del ciclo cellulare	pag 51

Analisi degli antigeni di superficie e valutazione dello stato di “commitment”	pag 54
Espressione dei geni della staminalità e dei fattori antiapoptotici	pag 57
Studio del potenziale differenziativo	pag 60
Studio del potenziale invasivo <i>in vitro</i> e del potenziale tumorigenico <i>in vivo</i>	pag 69
Discussione	pag 74
Bibliografia	pag 82
Indice	pag 97