

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Dottorato di ricerca in Neuroscienze



**TERAPIA EPIGENETICA NEL GLIOBLASTOMA
MULTIFORME: VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI
ANTINEOPLASTICI DI ACIDO VALPROICO E
RESVERATROLO SU LINEE DI
CELLULE STAMINALI TUMORALI**

Coordinatore: Prof. Guido Cavaletti

Tutor: Prof.ssa Leda Dalprà

Tesi di Dottorato di:

Gabriele Riva

m. 075690

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

RIASSUNTO	1
INTRODUZIONE	4
1. L'epigenetica e il cancro	5
1.1 Meccanismi fisiologici di regolazione epigenetica	5
1.2 Aberrazioni epigenetiche nel cancro	10
1.3 L'origine epigenetica dei progenitori tumorali	17
2. La terapia epigenetica nel cancro	20
2.1 Inibitori delle DNMTs	21
2.2 Inibitori delle HDACs	22
2.3 Inibitori e attivatori delle Sirtuine	28
3. I tumori cerebrali	38
3.1 Il glioblastoma multiforme	41
3.2 Alterazioni epigenetiche nel glioblastoma multiforme	43
4. Le cellule staminali tumorali	45
4.1 La teoria delle <i>Cancer Stem Cells</i>	45
4.2 Cellule staminali tumorali cerebrali	47
5. Approcci terapeutici	55
SCOPO	59
MATERIALI E METODI	61
1. Linee cellulari	62
2. Farmaci	62
3. Colture cellulari	63
4. Conteggio cellulare	64
5. Saggio di vitalità cellulare: <i>MTT assay</i>	65
6. Allestimenti di preparati cromosomici e indice mitotico	67
7. Analisi della morfologia cellulare	68
8. Immunofluorescenza	68
9. Saggio di migrazione cellulare: <i>Wound healing assay</i>	71
10. Real time - PCR array	72
11. Western blot	76
12. Analisi statistica	80

RISULTATI	81
1. Effetti del trattamento con VPA e RSV sull'attività metabolica	82
2. Analisi dell'indice mitotico dopo trattamento con VPA e RSV	86
3. Analisi della morfologia cellulare dopo trattamento con VPA e RSV	87
4. Studio dell'espressione di marcatori di staminalità e differenziamento neurale dopo trattamento prolungato con VPA	94
5. Analisi degli effetti di VPA e RSV sulla motilità cellulare	102
6. Analisi degli effetti di VPA e RSV sul <i>pathway</i> di Wnt	110
DISCUSSIONE	122
SUPPLEMENTI	138
BIBLIOGRAFIA	140

Riassunto

Il glioblastoma multiforme (GBM) è la neoplasia maligna più frequente fra i tumori cerebrali primari. La prognosi è, generalmente, infausta, in quanto le terapie attuali consentono una sopravvivenza media di soli 12-15 mesi dopo l'asportazione chirurgica, con una percentuale di recidiva pari all'80%. La principale causa del fallimento delle attuali strategie terapeutiche è la presenza, all'interno della massa tumorale, di una sottopopolazione di cellule con caratteristiche staminali, denominate *Brain Tumor Stem Cells* (BTSCs), in grado di sostenere la cancerogenesi, instaurare meccanismi di resistenza e determinare la recidiva. Di conseguenza, le BTSCs devono rappresentare il *target* principale dello sviluppo di nuove terapie, in quanto la loro eliminazione risulta essenziale per una definitiva eradicazione della neoplasia.

Negli ultimi anni, la comprensione del ruolo delle alterazioni epigenetiche nella cancerogenesi e nella progressione tumorale ha suggerito la possibilità di agire terapeuticamente su questo versante, al fine di ripristinare il fisiologico *status* epigenetico delle cellule, sfruttando la reversibilità delle aberrazioni epigenetiche.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare gli effetti antineoplastici di due farmaci ad azione epigenetica quali l'acido valproico (VPA), un inibitore delle istone deacetilasi di classe I e IIA, e il resveratrolo (RSV), un attivatore della sirtuina I, una istone deacetilasi di classe III, su sette linee di cellule staminali tumorali da GBM.

In primis, è stata eseguita un'analisi dell'attività metabolica sulle linee in studio, tramite *MTT assay*, per valutare se i due farmaci, somministrati per 24-48-72 ore a diverse concentrazioni, avessero un effetto inibitorio su questo parametro.

Successivamente, è stata effettuata l'analisi dell'indice mitotico su cellule trattate con VPA 2 mM e RSV 100 μ M per 48 ore al fine di verificare la presenza di un effetto antiproliferativo esercitato dai farmaci in studio. L'indice mitotico è risultato fortemente diminuito da entrambi i farmaci rispetto ai controlli.

Inoltre, è stato eseguito uno studio della morfologia cellulare dopo trattamento con concentrazioni crescenti di VPA e RSV: questo esperimento ha evidenziato l'insorgenza di drastiche variazioni della morfologia cellulare determinate dal VPA. In seguito, l'effetto prodifferenziativo del VPA, osservato dopo 14 e 30 giorni di esposizione alla concentrazione di 2 mM, è stato caratterizzato a livello molecolare tramite saggi di immunofluorescenza, che hanno permesso di identificare le variazioni dell'espressione di marcatori di staminalità (CD133 e Nestina) e differenziamento (GFAP, β III tubulina, MBP), in percentuali diverse a seconda della linea.

Per verificare se VPA e RSV fossero in grado di influenzare la motilità di queste cellule, le colture sono state incubate per 48-72-96 ore a differenti concentrazioni dei due farmaci ed è stato, successivamente, eseguito il saggio di migrazione *Wound Healing Assay*. Il trattamento con RSV ha mostrato un evidente effetto inibitorio sulla motilità cellulare, mentre il trattamento con VPA ha fatto registrare risposte più eterogenee tra le linee testate.

Infine, è stato verificato, tramite Real Time PCR array, se la somministrazione di VPA 2 mM e RSV 100 μ M per 96 ore fosse in grado di modificare l'espressione di geni coinvolti nel *pathway* molecolare di Wnt, un'importante via di segnalazione cellulare implicata nella regolazione della proliferazione, nell'induzione del differenziamento e nella migrazione cellulare. I risultati ottenuti hanno evidenziato un probabile effetto inibitorio del VPA sul *pathway* di Wnt canonico, suggerito anche dalla riduzione dei livelli di β catenina nucleare saggiati tramite *immunoblot*, mentre il RSV è sembrato, invece, promuovere tale via di trasduzione del segnale.

I risultati ottenuti incoraggiano l'utilizzo di farmaci epigenetici nel contesto di una futura terapia per la cura del glioblastoma multiforme, anche in combinazione con altri composti. Sono necessari ulteriori studi, sia *in vitro* che *in vivo*, al fine di confermare e di caratterizzare in maniera più approfondita gli effetti antineoplastici di tali farmaci.

Introduzione

1. L'epigenetica e il cancro

Il concetto di epigenetica è stato introdotto per la prima volta da C.H. Waddington nel 1942 per indicare l'interazione causale tra i geni ed i loro prodotti come responsabile dell'effettivo fenotipo di ciascun essere (Waddington, 1942). Oggi l'epigenetica è definita come lo studio dei cambiamenti ereditabili dell'espressione genica non causati da variazioni della sequenza primaria di DNA (Berger et al., 2009). Le modificazioni, acquisite in genere durante il normale processo di sviluppo ed ereditabili attraverso successive e multiple divisioni cellulari, costituiscono l'epigenoma, già definito da Waddington "*epigenetic landscape*", che permette a cellule derivate da un unico progenitore e contenenti, pertanto, il medesimo stesso patrimonio genetico, di avere diversi profili di espressione genica e di differenziarsi tra loro per acquisire funzioni e caratteristiche diverse. I meccanismi epigenetici, che comprendono la metilazione del DNA, le modificazioni covalenti post-traduzionali delle proteine istoniche, le modificazioni non covalenti, come l'incorporazione di varianti istoniche e il rimodellamento dei nucleosomi, gli RNAs non codificanti, come i microRNAs, influenzano in modo significativo l'espressione genica modulando l'organizzazione spaziale della cromatina, ovvero il *chromatin packaging*. Recentemente è stato dimostrato che in molte patologie, tra le quali il cancro, questi meccanismi epigenetici di controllo risultano alterati e compromessi (Esteller, 2007).

1.1 Meccanismi fisiologici di regolazione epigenetica

- La metilazione del DNA

La metilazione del DNA è una modificazione post-replicativa a carico del carbonio in posizione 5 della base azotata citosina. In seguito alla metilazione si ottiene una 5-metil-citosina (5mC), denominata anche "quinta base del DNA", la quale costituisce l'1% di tutte le basi azotate. Nei vertebrati il processo di metilazione coinvolge soprattutto le citosine appartenenti ai dinucleotidi CpG, localizzate all'interno di regioni chiamate 'isole CpG', o le citosine situate in regioni genomiche con sequenze altamente ripetute, come centromeri e retrotrasposoni. Le isole CpG sono regioni genomiche di almeno 200 paia di basi in cui la percentuale di nucleotidi CpG raggiunge il 50%. Nel resto del

genoma la frequenza di dinucleotidi CpG è, invece, 5 volte minore dell'atteso poiché le transizioni C-T avvengono con frequenza da 10 a 40 volte superiore rispetto ad altri eventi mutazionali, a causa della deaminazione della citosina metilata a timina. Le isole CpG sono localizzate preferenzialmente all'estremità 5' dei geni e occupano circa il 70% dei promotori dei geni umani housekeeping e tessuto-specifici.

La metilazione del DNA causa la repressione della trascrizione attraverso due meccanismi: il gruppo metile legato al C5 della citosina può impedire direttamente l'interazione dei fattori di trascrizione (es. *c-Myc* e *MLTF*) (Prendergast et al., 1991; Watt et al., 1988) oppure i siti CpG metilati possono essere riconosciuti dalle MBPs (mCpG binding proteins), che reclutano altri complessi repressori, come le istone deacetilasi, che provocano il passaggio della cromatina ad una conformazione "chiusa" (Jones et al., 1998; Nane et al., 1998).

L'addizione covalente di un gruppo metile alla citosina è catalizzata dalle DNA metiltransferasi (DNMT) (Chen and Li, 2006). Si tratta di una famiglia costituita da 5 membri (Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b e Dnmt3L), ognuno dei quali possiede un dominio attivo altamente conservato nell'evoluzione e mostra il medesimo meccanismo catalitico (Goll and Bestor, 2005).

Sono stati individuati due tipi diversi di metilazione: una metilazione di mantenimento del pattern epigenetico durante i cicli di replicazione e una metilazione *de novo*.

Durante la replicazione del DNA, ciascuna doppia elica neoformata è emimetilata: un filamento conserva la metilazione parentale mentre l'altro non è metilato. La metiltransferasi di mantenimento (DNMT1) riconoscono l'emimetilazione e metilano il nuovo filamento per ripristinare la metilazione parentale (Bestor, 2000). In questo modo la metiltransferasi DNMT1 permette di mantenere le informazioni di tipo epigenetico, accoppiandole con quelle genetiche con un'efficienza del 96% (Chuang et al., 1997; Easwaran et al., 2004; Leonhardt et al., 1992).

Della metilazione *de novo*, che avviene durante lo sviluppo embrionale, sono invece responsabili le Dnmt3a e 3b (Kaneda et al., 2004; Okano et al., 1999). La Dnmt3L interagisce con le Dnmt3a e 3b, stimolando la loro attività catalitica, essenziale per l'imprinting materno e la metilazione degli elementi retrotrasponibili nella linea germinale maschile (Bourc'his et al., 2001; Hata et al., 2002).

La maggioranza dei dinucleotidi CpG, situati nelle isole CpG dei promotori dei geni, risulta non metilata (Suzuki et al., 2008). Alcune isole CpG vengono, tuttavia, metilate durante lo sviluppo al fine di consentire il differenziamento attraverso un silenziamento

trascrizionale a lungo termine (Eckhardt et al., 2006, Illingworth et al., 2008). I siti CpG, situati nelle regioni altamente ripetute, (DNA non codificante e retrotrasposoni) permangono in un stato di elevata metilazione costante per garantire stabilità al genoma (Suzuki et al., 2008).

Benchè esistano evidenze dell'esistenza di un processo di demetilazione del DNA, non sono ancora chiare le modalità con cui questo avvenga: potrebbe avvenire attraverso la rimozione diretta del gruppo metilico oppure attraverso l'iniziale deaminazione della 5-metilcitosina a timina da parte di Dnmt3a/3b e delle apoB mRNA-editing catalytic polipeptide (APOBEC) citosina deaminasi, con il successivo intervento del sistema Base Excision Repair (BER), in grado di ripristinare la corretta base azotata (Schmitz et al., 2009; Ma et al., 2009).

Mentre il ruolo della metilazione delle isole CpG dei promotori nel silenziamento genico è ben definito, molto meno si conosce sul ruolo della metilazione dei promotori privi di isole CpG. Recenti studi hanno dimostrato che la metilazione del DNA è fondamentale anche nella regolazione dell'espressione di geni i cui promotori sono caratterizzati dall'assenza di isole CpG. Ad esempio, è stato osservato che l'espressione tessuto-specifica del gene *MASPIN* e i livelli di espressione di *OCT-4*, i cui promotori non presentano isole CpG, sono regolati dalla metilazione di dinucleotidi CpG nelle cosiddette "isole non-CpG" (Futscher et al., 2002). Dal momento che le isole CpG occupano solo il 60% dei promotori dei geni umani, è indispensabile chiarire il ruolo della metilazione dei promotori privi di isole CpG, al fine di comprendere pienamente il ruolo globale della metilazione del DNA nei tessuti normali (Wang et al., 2004).

- Le modificazioni covalenti degli istoni

Gli istoni, proteine cariche positivamente coinvolte nella formazione dei nucleosomi e nella determinazione della struttura cromatinica, possono subire modificazioni covalenti post-traduzionali di varia natura, come metilazione, acetilazione, ubiquitinazione, sumoilazione, citrullinazione, ADP-ribosilazione e fosforilazione (Kouzarides et al., 2007), che costituiscono il "codice istonico". Tali modificazioni avvengono in corrispondenza di diversi residui delle code N-terminali degli istoni e determinano variazioni nell'accessibilità trascrizionale della cromatina o reclutano proteine effettrici. Al contrario della metilazione del DNA, le modificazioni delle code istoniche possono determinare sia l'attivazione che la repressione della trascrizione a seconda del residuo

modificato e del tipo di modificazione presente. E' stato riportato, ad esempio, che la trimetilazione della lisina 4 nell'istone 3 (H3K4me3) è soprattutto presente in prossimità dei promotori di geni trascrizionalmente attivi, mentre la trimetilazione della lisina 9 nell'istone 3 (H3K9me3) e della lisina 27 dell'istone 3 (H3K27me3) sono localizzate nei pressi dei promotori dei geni trascrizionalmente repressi, costituendo il principale meccanismo di silenziamento (Kourazides 2007).

La modificazione istonica più studiata è l'acetilazione, prevalentemente a carico di residui di lisina, che, apportando una carica negativa, causa l'indebolimento dell'interazione elettrostatica degli istoni con il DNA, anch'esso carico negativamente, e la decondensazione della cromatina. Di conseguenza l'acetilazione delle code istoniche, favorendo il legame di fattori di trascrizione al DNA, è associata ad attivazione trascrizionale. Le modificazioni istoniche sono regolate da diversi enzimi: le istone acetiltransferasi (HATs) e le istone metiltransferasi (HMTs) aggiungono, rispettivamente, gruppi acetile e gruppi metile, mentre le istone deacetilasi (HDACs) e le istone demetilasi (HDMs), rispettivamente, li rimuovono. Le HDACs possono essere suddivise in quattro classi. Nelle classi I, II e IV vi sono le istone deacetilasi zinco-dipendenti, mentre nella classe III sono presenti quelle NAD⁺-dipendenti, definite sirtuine, in quanto omologhe di Sir2 di lievito.

Nelle cellule embrionali staminali, a livello dei promotori di geni importanti per lo sviluppo, sono presenti regioni cromatiniche, definite "domini bivalenti", in quanto all'interno di esse coesistono modificazioni epigenetiche attivanti e repressive (Bernstein et al., 2006; Azuara et al., 2006), instaurate dall'attività di due importanti complessi regolatori. Il Polycomb group catalizza la trimetilazione della lisina 27 dell'istone 3 (H3K27me3) necessaria per il mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali embrionali poiché silenzia geni specifici del differenziamento, mentre il Trithorax group catalizza la trimetilazione della lisina 4 dell'istone 3 (H3K4me3) richiesta per il mantenimento di uno stato cromatinico attivo durante lo sviluppo (Ringrose et al., 2007). Questa bivalenza garantisce plasticità fenotipica, consentendo alle cellule embrionali staminali di regolare rapidamente l'espressione genica durante i vari processi di differenziamento.

Le cellule differenziate perdono questa bivalenza e acquisiscono, invece, una struttura cromatinica più rigida, importante per mantenere la corretta identità cellulare (silenziando o attivando determinati geni) (Mikkelsen et al., 2007). Questa ipotesi è supportata dalla recente scoperta di ampie regioni cromatiniche condensate che

presentano la dimetilazione della lisina 9 dell'istone 3 (H3K9me2), un marchio repressivo. Per tale motivo, esse sono state denominate LOCKs (Large Organized Chromatin K9 modifications) e si pensa che servano a silenziare estese porzioni genomiche nei tessuti differenziati (Wen et al., 2009).

- Il rimodellamento dei nucleosomi e le varianti istoniche

Il nucleosoma è l'unità fondamentale della cromatina ed è composto da un *core* proteico, costituito dagli istoni H2A, H2B, H3 e H4, attorno al quale si avvolge il DNA. Il rimodellamento dei nucleosomi e la sostituzione delle canoniche proteine istoniche con varianti istoniche specializzate sono anch'essi attori della regolazione epigenetica.

I nucleosomi regolano l'espressione genica alterando l'accessibilità dei fattori di trascrizione a regioni di DNA regolatorie (Jiang et al., 2009). Studi *genome-wide*, relativi al posizionamento dei nucleosomi in diversi organismi eucariotici, hanno rivelato una comune organizzazione: i nucleosomi sono caratterizzati, in genere, da una precisa localizzazione intorno ai promotori dei geni. Le *nucleosome-free region* (NFRs) situate alle estremità 5' e 3' dei geni costituiscono il sito in cui avviene l'assemblaggio e il disassemblaggio del macchinario trascrizionale. La perdita di un nucleosoma direttamente a monte del sito di inizio della trascrizione è strettamente correlata con l'attivazione del gene (Shivaswamy et al., 2008; Li et al., 2007); la presenza, inoltre, di un NFR in corrispondenza dei promotori di geni con livelli basali di trascrizione è associata alla loro capacità di attivazione in seguito a precisi stimoli. Al contrario la presenza di un nucleosoma in corrispondenza del sito di inizio della trascrizione implica la repressione genica (Schones et al., 2008). La modulazione delle *nucleosome-free regions* (NFRs) è diretta da complessi proteici ATP dipendenti, come NuRD, che sono in grado di rimodellare la cromatina, spostando i nucleosomi (Smith et al., 2005).

L'incorporazione di varianti istoniche nei nucleosomi, come H3.3 e H2A.Z, influenza la localizzazione dei nucleosomi stessi e, quindi, l'attività dei geni (Santenard et al., 2009; Sarma et al., 2005). Le due varianti citate sono prevalentemente presenti in prossimità di promotori di geni attivi e possono promuoverne l'attivazione influenzando la stabilità dei nucleosomi e proteggendo i geni dalla metilazione (Jin et al., 2007; Zilbermann et al., 2008). Come le proteine istoniche canoniche anche le varianti istoniche possono subire modificazioni post-traduzionali che ne determinano la localizzazione nucleare e

la funzione. Ad esempio l'istone H2A.Z acetilato è principalmente associato a geni attivi in eucromatina, mentre lo stesso istone ubiquitinato è associato a eterocromatina facoltativa (Zlatanova et al., 2008; Svotelis et al., 2009). L'interazione del rimodellamento dei nucleosomi con la metilazione del DNA e con le modificazioni istoniche gioca un ruolo centrale nella determinazione dell'espressione genica globale e dell'architettura cromatinica.

- I miRNAs

I miRNAs sono piccoli RNA non codificanti, lunghi 22 nucleotidi, che regolano l'espressione genica attraverso il silenziamento post-trascrizionale di specifici geni *target*. L'appaiamento dei miRNAs con la regione 3' non tradotta di mRNA *target*, ne causa la degradazione o ne inibisce la traduzione, in base all'omologia di sequenza (He et al., 2004). I miRNAs sono espressi in modo tessuto-specifico e controllano un'ampia varietà di processi biologici, come la proliferazione cellulare, l'apoptosi e il differenziamento. L'espressione dei miRNAs, come quella di tutti i geni, può essere regolata da meccanismi epigenetici (Saito et al., 2006). I miRNAs, a loro volta, sono in grado di controllare i meccanismi epigenetici, in quanto possono avere come *target* anche enzimi responsabili della metilazione del DNA (DNMT3a e DNMT3b) o delle modificazioni istoniche (EZH2) (Fabbri et al., 2007; Friedman et al., 2009).

1.2 Aberrazioni epigenetiche nel cancro

Fino a pochi anni fa si pensava che le mutazioni genetiche rappresentassero la caratteristica distintiva delle neoplasie. Sebbene lo studio di queste alterazioni sia stato, per molti anni, il principale oggetto di interesse dalla ricerca oncologica, si è fatta strada la consapevolezza che modificazioni e aberrazioni epigenetiche sono altrettanto responsabili dell'inizio e della progressione del processo di tumorigenesi. Attualmente gli studiosi sono concordi nell'affermare che il cancro, oltre ad avere cause genetiche, può essere considerato a tutti gli effetti una "malattia epigenetica". L'epigenoma tumorale è caratterizzato da notevoli cambiamenti nella metilazione del DNA e nei pattern di modificazione istonica; risultano, inoltre, alterati i profili di espressione degli enzimi in grado di modificare la cromatina. Questo comporta una globale alterazione

dei profili di espressione genica [Fig.1]. Da queste evidenze nasce l'idea di una terapia epigenetica, mirata a ripristinare il fisiologico stato epigenetico della cellula, attraverso l'inibizione o l'attivazione farmacologica di specifici enzimi implicati nel *chromatin remodelling*.

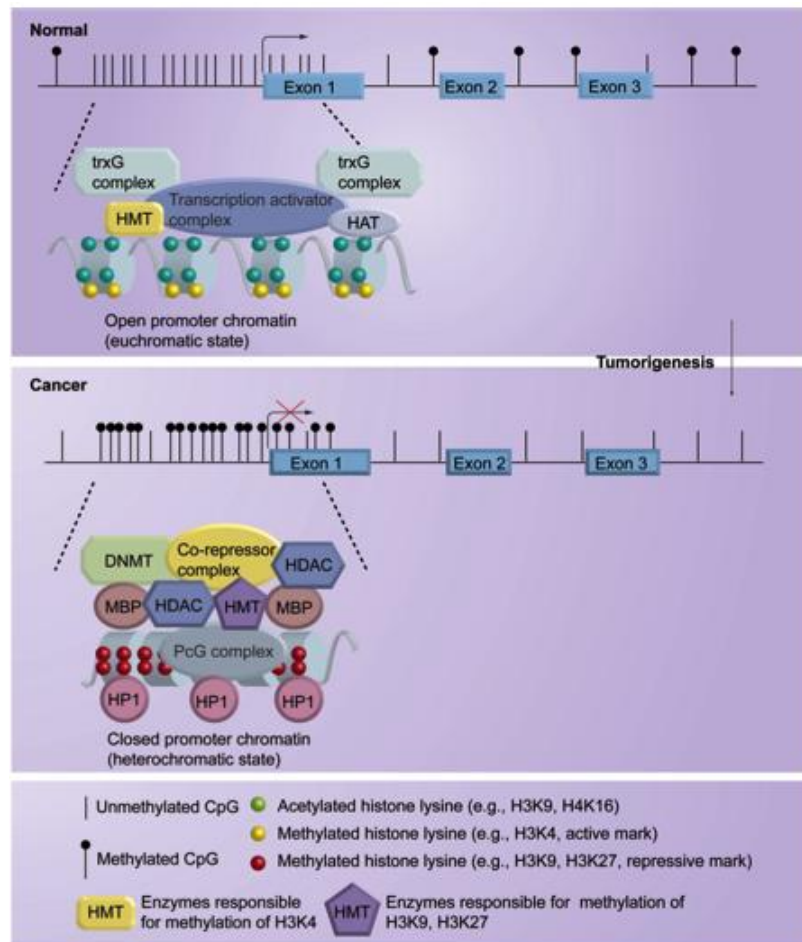


Figura 1. Rappresentazione schematica delle alterazioni epigenetiche nel cancro. (Pang-Kuo Lo et al., 2008)

- Il metiloma tumorale

Il metiloma tumorale è caratterizzato da una globale ipometilazione e da un'ipermetilazione sito-specifica (Esteller, 2008; Jones and Baylin, 2002). L'ipometilazione nelle cellule tumorali interessa diverse sequenze genomiche, come sequenze ripetute di DNA, retrotrasposoni, introni e promotori di proto-oncogeni. L'ipometilazione delle sequenze ripetute causa instabilità genomica favorendo riarrangiamenti cromosomici anomali (Eden et al., 2003; Esteller, 2008), mentre quella

dei retrotrasposoni provoca l'attivazione e la traslocazione degli stessi in altre regioni del genoma (Howard et al., 2008). La demetilazione di isole CpG di promotori, generalmente metilate a livello di tessuti somatici normali, causa l'attivazione di geni, solitamente repressi, che promuovono la proliferazione cellulare, come *RRAS*, *CCND2* (ciclina D2) e *MASPIN* nel tumore gastrico, *MAGE* nel melanoma, *HPV16* (human papillomavirus 16) nel cancro cervicale, *S100* nel tumore del colon (Feinberg and Tycko, 2004; Wilson et al., 2007). La demetilazione, inoltre, può causare la perdita dell'imprinting genomico: ad esempio, la perdita dell'imprinting di *IGF2*, un importante fattore di crescita autocrino, porta ad un aumento del rischio di neoplasia colon-rettale (Cui et al., 2003) e contribuisce allo sviluppo del tumore di Wilms (Feinberg, 1999).

L'ipermetilazione sito-specifica avviene, prevalentemente, a carico delle isole CpG presenti nei promotori dei geni oncosoppressori, causandone il silenziamento. Questo fenomeno è stato riscontrato, ad esempio, a carico del promotore del gene *Rb* nel retinoblastoma (Greger et al., 1989), ma anche del gene *CDKN2A*, che codifica per la proteina p16 in grado di arrestare il ciclo cellulare bloccando la funzionalità di MDM2 e promuovendo così l'azione di p53 (Baylin, 2005). Anche geni che controllano la riparazione del DNA, come *MLH1* e *BRCA1*, il ciclo cellulare, l'adesione cellulare, l'apoptosi e l'angiogenesi risultano silenziati in molte neoplasie a causa dell'ipermetilazione dei loro promotori o della mancata espressione di geni codificanti per fattori di trascrizione ad essi correlati, come ad esempio *RUNX3* nel cancro dell'esofago e *GATA4* e *GATA5* nel tumore gastrico e colon-rettale (Akiyama et al., 2003; Long et al., 2007).

Il profilo di metilazione di isole CpG in geni oncosoppressori, specifico per i diversi tipi di tumore, è definito "ipermetiloma". Questo meccanismo di silenziamento degli oncosoppressori è presente sia nei tumori sporadici che in quelli ereditari, dove costituisce il secondo "hit", in accordo con il modello *two-hit* elaborato da Knudson, in grado di iniziare la cancerogenesi (Jones et al., 1999). A differenza degli oncogeni, per gli oncosoppressori è necessario che entrambi gli alleli siano mutati perché si manifesti un effetto. Nei casi in cui sia presente la mutazione di un singolo allele, il silenziamento attraverso meccanismi epigenetici del secondo allele può fornire il secondo "hit" oncogenico, con la conseguente inattivazione di geni oncosoppressori.

Infine, anche la deregolazione di vie di segnalazione intracellulare, riscontrata in varie neoplasie, potrebbe essere causata da aberrazioni epigenetiche a carico di geni coinvolti; ad esempio, in diversi tumori è stato osservato un silenziamento epigenetico di geni, tra

i quali *APC*, *WIF-1* (Wnt inhibitory factor) e *SFRP*, che causa un'alterata attivazione di β -catenina (Jones et al., 2007).

Negli ultimi anni la deregolazione di proteine che intervengono nel processo di modificazione epigenetica è stata osservata e studiata in molti tipi di neoplasie. Le DNMTs mutate, con espressione aumentata o reclutate in modo anomalo svolgono un ruolo fondamentale nel determinare e mantenere una metilazione aberrante del DNA nelle cellule tumorali. Una caratteristica comune dei tessuti tumorali sembra essere l'aumento di espressione di DNMT1 (Issa et al., 1993). Tuttavia, in uno studio condotto da Gaudet e colleghi nel 2003, è stato riportato che topi portatori di un particolare allele di DNMT1, determinante una riduzione dell'espressione di DNMT1 del 10 % rispetto ai livelli *wild type* e, quindi, una sostanziale ipometilazione *genome-wide* in tutti i tessuti, sviluppano linfomi a cellule T aggressivi. E' stato osservato, inoltre, che sia DNMT3a che DNMT3b sono altamente espresse nei tessuti tumorali, ma solo DNMT3b sembra essere implicata nella tumorigenesi (Linhart et al., 2007).

I meccanismi che determinano alterazioni nel profilo di metilazione solo nelle isole CpG di specifici geni non sono stati ancora completamente chiariti. Si ipotizza che il silenziamento tramite ipermetilazione possa conferire un vantaggio nella crescita cellulare, inducendo la selezione di un clone e la sua proliferazione. Una seconda ipotesi suggerisce che la metilazione di alcune isole CpG potrebbe avvenire in seguito ad un meccanismo sequenza-specifico attraverso il quale l'attività delle metiltransferasi *de novo* sarebbe diretta sui geni *target* da fattori di trascrizione aberranti. Ciò avviene nella leucemia promielocitica acuta in cui la proteina di fusione PML-RAR α promuove il silenziamento di geni importanti per il differenziamento granulocito-macrofagico (Di Croce et al., 2002).

Alcune isole CpG, inoltre, potrebbero essere metilate nel cancro a causa dell'ipermetilazione di estese porzioni di DNA adiacenti, che provocherebbe una riprogrammazione epigenetica su larga scala (Frigola et al., 2006). Infine, anche le modificazioni istoniche potrebbero avere un ruolo nel veicolare le DNMTs verso specifici geni: molti geni ipermetilati in diversi tipi di tumore presentano il marchio epigenetico H3K27me3, dovuto all'azione del Polycomb Group (Schlesinger et al., 2007; Ohm et al., 2007). Questa osservazione spiega parzialmente la teoria del *CpG Island methylator phenotype* o CIMP. Secondo tale teoria esiste una precisa e coordinata metilazione di una parte delle isole CpG nei tumori, poiché molte di queste

CIMP sono *target* noti del Polycomb Group (Widschwendter et al., 2007; Weisenberger et al., 2006). Il marchio epigenetico sopra descritto è tipico anche delle cellule staminali, dove collabora al mantenimento dello stato cromatinico bivalente; ciò suggerisce l'esistenza di un'interessante correlazione tra la regolazione dello sviluppo e la tumorigenesi. Secondo alcuni studi nelle cellule staminali normali l'acquisizione della metilazione del promotore da parte dei geni coinvolti nel differenziamento, soggetti in quel contesto a temporaneo silenziamento tramite il meccanismo dei domini bivalenti, conduce ad un blocco della cellula nel fenotipo staminale e promuove un'abnorme espansione clonale, predisponendo l'individuo allo sviluppo di una neoplasia (Widschwendter et al., 2007; Ohm et al., 2007).

- Le variazioni delle modificazioni istoniche nel cancro

Recenti studi *genome-wide* hanno stabilito un profilo delle modificazioni istoniche presenti in diverse cellule tumorali, rivelando una globale perdita di acetilazione della lisina 16 (H4K16ac) e una perdita di trimetilazione della lisina 20 dell'istone 4. Queste alterazioni, presenti principalmente in corrispondenza di sequenze di DNA ripetute, già ipometilate nelle cellule tumorali, sopraggiungono precocemente e si accumulano durante lo sviluppo tumorale. Il fatto che queste variazioni si verifichino precocemente, nello stesso modo in cui l'ipermetilazione delle isole CpG precede le mutazioni di *KRAS* nel tumore del colon-retto (Esteller et al., 2004), dimostra che queste costituiscono uno *step* fondamentale nel processo di cancerogenesi (Fraga et al., 2005). In diverse neoplasie sono state ritrovate alterazioni a carico di enzimi che aggiungono, rimuovono e riconoscono specifiche modificazioni istoniche.

La perdita dell'acetilazione istonica è mediata dalle HDACs, *over-esprese* in numerosi tipi di tumore (Halkidou et al., 2004; Song et al., 2005) e, quindi, oggetto di studio per lo sviluppo di eventuali terapie epigenetiche che mirino ad inibirne l'attività.

Le sirtuine, e in particolare SIRT1, risultano *up-regolate* in molti tumori (prostata, carcinoma epatocellulare, leucemia mieloide acuta, melanoma, colon-retto), ma ridotte in altri (glioblastoma, ovaio, vescica) (Wang et al., 2011; Wang et al., 2008; Kbra et al., 2009).

Anche le HATs, che insieme alle HDACs controllano i livelli di acetilazione degli istoni, sono alterate nel cancro a causa di traslocazioni cromosomiche che ne determinano la fusione con altre proteine. Ad esempio, in molte leucemie, i geni delle

istone acetiltransferasi p300 e CBP sono spesso coinvolti in traslocazioni bilanciate con i geni *MOZ*, *MORF* e *MLL*, dando origine a proteine di fusione con proprietà acetiltrasferasica nei confronti dei geni bersaglio di questi ultimi (Yang, 2004).

In molte forme neoplastiche sono state ritrovate anche alterazioni nei pattern di metilazione della lisina 9 e 27 dell'istone 3, associate a silenziamento genico (Nguyen et al., 2002; Valk-Lingbeek et al., 2004) e dovute a variazioni dell'espressione delle istone metiltransferasi (HMTs), responsabili dell'instaurazione di marchi repressivi. EZH2, l'HMT responsabile della metilazione della lisina 27 dell'istone 3, *over-espressa* in alcuni tumori solidi come quello alla prostata, seno, colon, pelle e al polmone (Bracken and Helin, 2009), promuove l'angiogenesi attraverso il silenziamento del gene che codifica per la vasoibina-1 nel cancro ovarico (Lu et al., 2010). Tuttavia, nonostante la sua azione tumorigenica sia stata oggetto di molti studi, alcune recenti scoperte hanno dimostrato un'inattivazione di EZH2 in linfomi follicolari e a grandi cellule B (Chi et al., 2010; Morin et al., 2010).

Livelli aumentati di G9a, l'istone metiltransferasi responsabile della metilazione della lisina 9 dell'istone 3, sono stati riscontrati nell'epatocarcinoma (Kondo et al., 2007), mentre traslocazioni cromosomiche che coinvolgono il gene *MLL*, l'istone metiltransferasi responsabile della metilazione della lisina 4 dell'istone 3, svolgono un ruolo fondamentale nella progressione di alcune leucemie (Krivtsov et al., 2007). SMYD3, un'altra istone metiltransferasi responsabile della metilazione della lisina 4 dell'istone 3, è *over-espressa* nei tumori del colon-retto e epatocellulare, dove promuove la crescita cellulare e il processo di trasformazione neoplastica (Hamamoto et al., 2004). Anche le istone demetilasi (HDMs) risultano essere coinvolte nella progressione tumorale (Cloos et al., 2008). La LSD1 (Lisine-Specific Demetilase 1), e altri enzimi in seguito identificati, caratterizzati dalla presenza del dominio Jumonji C, possono agire rimuovendo sia metilazioni attivanti che repressive, agendo contemporaneamente da co-repressori o da co-attivatori (Shi et al., 2007; Metzger et al., 2005). Tali proteine risultano *up-regolate* nel cancro prostatico e la loro inibizione nel neuroblastoma provoca una marcata diminuzione della proliferazione *in vitro* (Schulte et al., 2009). Sono necessari ulteriori studi relativi al duplice funzionamento delle HDMs, affinché possano essere utilizzate come potenziale *target* terapeutico.

- Il rimodellamento dei nucleosomi e le varianti istoniche nel cancro

Il rimodellamento dei nucleosomi, insieme alla metilazione del DNA e alle modificazioni istoniche, svolge un ruolo fondamentale nel silenziamento genico caratteristico dei tumori. Il silenziamento di geni oncosoppressori, dovuto alla metilazione di specifiche sequenze di DNA, comporta una variazione del posizionamento dei nucleosomi, che tendono ad occupare i siti di inizio della trascrizione, impedendola; infatti la riattivazione dei geni silenziati, mediante l'uso di inibitori delle DNMTs, è accompagnata dalla traslocazione dei nucleosomi dai promotori (Lin et al., 2007). Il rimodellamento dei nucleosomi, inoltre, può causare un aberrante silenziamento genico attraverso l'apporto di marchi epigenetici repressivi in prossimità dei promotori di geni oncosoppressori. In un recente lavoro, effettuato da Morey e colleghi nel 2008, è stato dimostrato che il rimodellamento dei nucleosomi e il reclutamento di complessi proteici repressori con attività deacetilasica, come NuRD, svolgono un ruolo centrale nel silenziamento genico aberrante presente in alcune leucemie, mediato dal fattore di trascrizione oncogenico PML-RAR α . Il complesso NuRD facilita il reclutamento di Polycomb group 2 e di DNMT3a in corrispondenza dei promotori dei geni *target* di PML-RAR α , causandone il silenziamento. NuRD, inoltre, reclutata in prossimità dei promotori metilati, grazie alla sua interazione con le methyl binding domain 2 protein, contribuisce al mantenimento del silenziamento genico (Feng et al., 2001).

Alterazioni nel complesso SWI-SNF, un complesso ATP-dipendente in grado di rimodellare la cromatina, sono associate allo sviluppo di alcuni tumori (Reisman et al., 2009). L'inibizione della subunità BAF47 (hSNF5) nei rhabdomyosarcomi causa l'inattivazione dei *pathway* di p21 e p16 e la trasformazione neoplastica (Chai et al., 2005). Le subunità catalitiche BRG1 e BRM, inoltre, sono silenziate nel 15-20% dei tumori polmonari non a piccole cellule (Reisman et al., 2003).

L'incorporazione delle varianti istoniche è implicata nella tumorigenesi. La variante H2A.Z presenta un'aumentata espressione in molti tipi di tumore ed è coinvolta nella promozione del ciclo cellulare (Svetelits et al., 2009). Anche la perdita di questa variante istonica è associata alla progressione tumorale attraverso un meccanismo di destabilizzazione cromosomica che comporta un'ipermetilazione dei promotori dei geni oncosoppressori (Witcher et al., 2009).

- Deregolazione dei miRNAs nei tumori

Recenti studi hanno dimostrato una variazione del *pattern* di espressione di miRNAs tra i tumori e i corrispondenti tessuti normali (Lu et al., 2005). Dal momento che i miRNAs regolano geni coinvolti in processi come la proliferazione cellulare, l'apoptosi e il differenziamento, alterazioni della loro espressione possono promuovere la tumorigenesi. Molti miRNAs aventi la funzione di oncosoppressori sono repressi in diverse neoplasie. Ad esempio, miR-15 e miR-16, che hanno come bersaglio *BCL2*, un gene antiapoptotico, sono *down-regolati* nella leucemia linfatica cronica, mentre let-7, che colpisce l'oncogene *RAS*, è *down-regolato* nel tumore del polmone (Zhang et al., 2007; Ventura et al., 2009); MiR-127, che ha come gene *target* *BCL6*, è *down-regolato* nei tumori della prostata e della vescica (Saito et al., 2006), miR-101, che ha come bersaglio la proteina *EZH2* è *down-regolato* nel tumore della vescica a cellule di transizione (Friedman et al., 2009).

La repressione dei miRNAs oncosoppressori è dovuta alla ipermetilazione delle regioni regolatorie al 5' (Lujambio et al., 2008; Toyota et al., 2008). Questo meccanismo di *down-regolazione* è stato dimostrato per la prima volta nel lavoro di Saito e colleghi, i quali osservarono che miR-127, un miRNA oncosoppressore situato all'interno di un'isola CpG, risultava silenziato nel cancro attraverso la metilazione del DNA (Saito et al., 2006).

I miRNA aventi la funzione di oncogeni sono spesso *up-regolati* nel cancro. Per esempio miR-21, che ha come *target* *PTEN*, è *up-regolato* in glioblastoma (Kluiver et al., 2006), il complesso miR-17-miR-92, che ha come bersaglio il gene pro-apoptotico *BIM*, è *over-espresso* in diverse neoplasie (Mendell et al., 2008).

1.3 L'origine epigenetica dei progenitori tumorali

Negli ultimi anni, numerosi studi, hanno dimostrato che meccanismi epigenetici, come il silenziamento di *tumor suppressor genes* e l'attivazione di oncogeni, sono coinvolti in tutti gli stadi del processo di cancerogenesi, suggerendo che l'eziologia dei tumori possa essere sia genetica che epigenetica (Feinberg et al., 2004). Il riscontro precoce di aberrazioni epigenetiche nei tumori e nel tessuto circostante normale suggerisce che tali modificazioni nelle cellule staminali o nei loro diretti progenitori siano alla base del

rischio di incorrere in una determinata neoplasia, della progressione tumorale e dell'eterogeneità cellulare nelle fasi avanzate della malattia (Feinberg et al., 2006).

Nello studio di Feinberg e colleghi, in cui viene illustrato il modello epigenetico dei progenitori tumorali, che integra la teoria delle cellule tumorali staminali con le evidenze di alterazioni epigenetiche nelle prime fasi dello sviluppo delle neoplasie, sono state individuati tre stadi per definire l'esordio e lo sviluppo di un tumore [Fig.2].

Nel primo stadio si verifica l'insorgenza di alterazioni epigenetiche a carico delle cellule staminali o dei progenitori di un determinato tessuto. Si tratta di eventi determinati da un'alterata regolazione dei cosiddetti *Tumor Progenitor Genes* (TPGs): il risultato è la comparsa di una popolazione policlonale di cellule prone a sviluppare una neoplasia. I TPGs possono essere geni che regolano la staminalità cellulare stessa, come OCT4, FOXD3 e NANOG (Chambers et al., 2003; Hanna et al., 2002; Nichols et al., 1998), geni implicati nella risposta ai danni indotti da stress ambientali, geni che agiscono sulla struttura cromatinica, come le deaminasi della famiglia APOBEC che trasformano per deaminazione una metilcitosina in timina provocando una variazione sia epigenetica che genetica (Beale et al., 2004), EZH2, codificante per una proteina del Polycomb Complex Group che agisce a livello epigenetico (Cha et al., 2005), geni che regolano la migrazione cellulare come β -catenina, caderina E e le integrine (Yoshiura et al., 1995). Le alterazioni epigenetiche a carico dei TPGs possono perturbare il fisiologico rapporto numerico tra progenitori indifferenziati e cellule differenziate all'interno della nicchia staminale, sbilanciandolo a favore dei primi, fornendo la base per l'attuazione di un programma di differenziazione aberrante o provocare la traslocazione di alcune cellule staminali in contesti diversi dalla nicchia staminale.

Il secondo stadio del modello di Feinberg prevede l'insorgenza di una mutazione iniziante, specifica per ogni tipo di tumore, di un gene *gatekeeper* (geni oncosoppressori che controllano la proliferazione cellulare) in una sottopopolazione di quei progenitori cellulari che avevano subito precedentemente le alterazioni epigenetiche determinate dai TPG (Futreal et al., 2004). Le alterazioni epigenetiche possono aggiungersi alle mutazioni genetiche e far parte, quindi, di questo secondo *step*.

Nel terzo stadio, intervengono meccanismi genetici, come l'erosione dei telomeri nelle cellule tumorali in cui non è attiva la telomerasi (Artandi et al., 2000) e la presenza di instabilità delle sequenze palindromiche nel DNA (Tanaka et al., 2005), ed epigenetici. Per quanto riguarda questi ultimi, risultano rilevanti l'ipometilazione dell'eterocromatina centromerica e le alterazioni di geni codificanti per modificatori

della cromatina come EZH2, una istone metiltransferasi *over-espressa* nel cancro prostatico metastatico con azione silenziante (Kuzmichev et al., 2004; Sellers and Loda, 2002), l'Heterochromatin Protein 1 α , correlabile con l'invasività di un tumore (Kirschmann et al., 2000), e MLL1, una HMT specifica per H3K4, con azione attivante, e che risulta attivata costitutivamente in molti tumori umani (Hess, 2004).

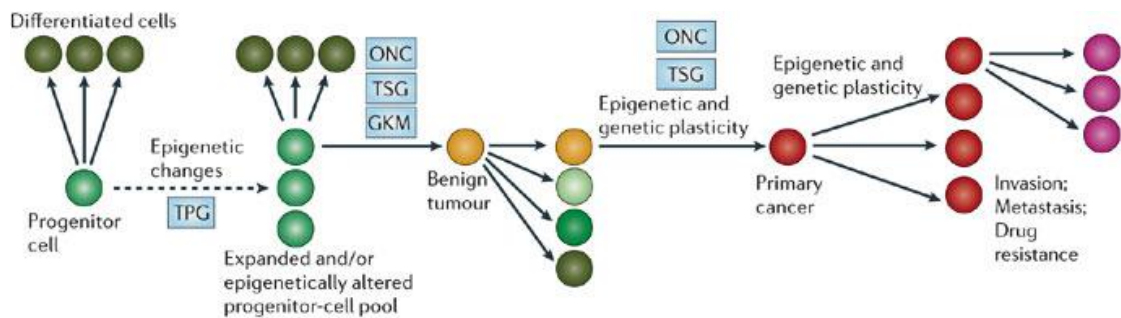


Figura 2. Insorgenza tumorale secondo l'*epigenetic progenitor model of cancer* (Feinberg et al., 2006).

Il modello dell'origine epigenetica dei progenitori tumorali ha portato grandi progressi nella comprensione delle basi biologiche del cancro, del ruolo dell'ambiente e nella ricerca di interventi terapeutici. L'esistenza di progenitori epigeneticamente alterati implica che le fasi iniziali di progressione tumorale si verifichino prima che un patologo possa riconoscere una lesione pre-neoplastica. La presenza di tali alterazioni in una popolazione policlonale risulta in contrasto con il modello monoclonale di insorgenza del cancro, a lungo accettato, secondo il quale una neoplasia ha origine da una singola cellula trasformata a causa di una serie di alterazioni genetiche, responsabili della selezione clonale, dell'eterogeneità cellulare del tumore e dell'acquisizione di nuove proprietà da parte di quest'ultimo.

L'esistenza di lesioni epigenetiche in precursori potrebbe spiegare anche la relazione esistente tra l'esposizione a fattori ambientali e il cancro. I tumori, anche quelli benigni, impiegano molti anni per svilupparsi e l'esposizione cronica ad insulti ambientali, in grado di modificare l'espressione genica dei precursori, attraverso alterazioni epigenetiche, è considerata una delle cause principali della loro comparsa e progressione (Feinberg et al., 2006).

L'acquisizione da parte del tumore di proprietà inizialmente non possedute, come la capacità di metastatizzare e la resistenza ai farmaci, causa problemi importanti nella ricerca di terapie contro il cancro. Generalmente si ritiene che queste proprietà siano interamente dovute all'acquisizione di nuovi genotipi all'interno del tumore, attraverso

processi di evoluzione e selezione clonale. Tuttavia l'eterogeneità e la progressione tumorale possono essere spiegate indipendentemente dall'evoluzione genetica clonale. Se i tumori derivano da una popolazione policlonale di progenitori alterati epigeneticamente, la progressione tumorale potrebbe avvenire attraverso diversi meccanismi.

I progenitori tumorali che hanno acquisito una mutazione in un gene *gatekeeper* sono molto diversi, dal punto di vista epigenetico, dalle cellule della massa principale. Queste cellule progenitrici mutate, probabilmente, possiedono molte delle caratteristiche dei progenitori precoci alterati solo epigeneticamente: si dividono lentamente e sono prive dei caratteri di differenziamento presenti nelle cellule del cosiddetto *bulk of tumor*, anche se sono in grado di differenziare spontaneamente in queste ultime, in cellule di altri *lineages* oppure in cellule ancor più indifferenziate. Le proprietà che caratterizzano la progressione tumorale sono presenti, perciò, nelle cellule progenitrici mutate ed anche nei progenitori tumorali alterati solo dal punto di vista epigenetico.

La latenza dell'eterogeneità tumorale potrebbe dipendere dal fatto che la manifestazione delle modificazioni epigenetiche avviene solo in dipendenza del differenziamento. Considerare la capacità di metastatizzazione, non come una conseguenza di successive mutazioni e selezioni clonali all'interno di una massa tumorale di grandi dimensioni, ma come una proprietà già presente nel progenitore tumorale iniziale, potrebbe spiegare la comparsa di metastasi, con caratteristiche decisamente diverse da quelle del tumore primario, a molti anni di distanza dall'asportazione chirurgica (Feinberg et al., 2006). Le modificazioni epigenetiche possono, inoltre, rimanere silenti nel progenitore fino a che uno stress ambientale non induce una risposta cellulare. Ad esempio, possono essere fonte di stress cellulare l'ipossia presente nel microambiente tumorale e la tossicità dei farmaci antineoplastici, in quanto, inducendo una risposta, potrebbero smascherare le alterazioni epigenetiche esistenti nei progenitori tumorali (Mueller et al., 2004).

2. La terapia epigenetica nel cancro

Le aberrazioni epigenetiche presenti nel cancro sono processi reversibili, al contrario delle mutazioni genetiche, e, di conseguenza, costituiscono possibili *target* per terapie

antitumorali in grado di ripristinare il fisiologico stato epigenetico delle cellule. L'uso di farmaci che interferiscono con gli enzimi che modificano la cromatina, in particolare istone deacetilasi e DNA metiltrasferasi, infatti, possono avere effetti positivi nel trattamento clinico di pazienti affetti da cancro [Fig.3].

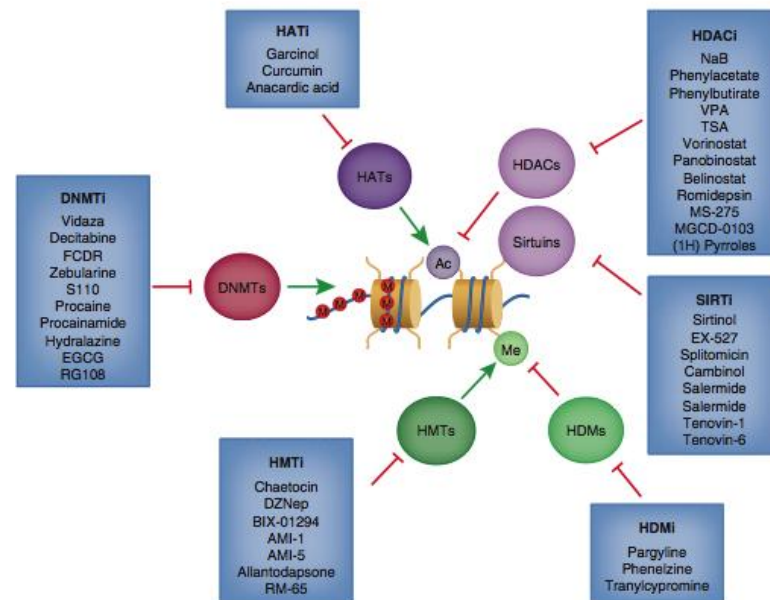


Figura 3. Terapia epigenetica nel cancro (Rodriguez-Paredes et al., 2011)

2.1 Inibitori delle DNMTs

L'ipermetilazione sito-specifica, presente in molti tumori, ha suggerito l'utilizzo di inibitori delle DNMTs per revertire l'eccesso di metilazione a carico delle isole CpG situate nei promotori dei geni oncosoppressori.

Gli inibitori delle DNMTs sono suddivisi in due gruppi a seconda del meccanismo d'azione. Il primo gruppo è costituito dagli analoghi dei nucleotidi, i quali svolgono la loro azione terapeutica durante la fase S del ciclo cellulare, già a basse concentrazioni. Essi sono più precisamente analoghi della citosina e vengono fosforilati e incorporati nella doppia elica del DNA. Quando le DNMTs si legano al DNA emimetilato, immediatamente formano dei legami covalenti irreversibili con questi farmaci. Ciò determina una deplezione cellulare di enzimi con attività metiltransferasica e la conseguente ipometilazione del filamento di DNA appena sintetizzato (Egger et al., 2004).

La capacità di questi farmaci di essere incorporati nel DNA ha sollevato preoccupazioni riguardo un loro potenziale effetto tossico sulle cellule normali. Studi relativi a

trattamenti a lungo termine con inibitori di DNMTs hanno dimostrato che gli effetti tossici sulle cellule normali sono minimi, poiché questi farmaci agiscono solo su cellule in rapida divisione (Yang et al., 2003).

I farmaci del secondo gruppo, denominati “non analoghi dei nucleotidi”, non vengono incorporati nel DNA e presentano meccanismi d’azione molto diversi tra loro: ad esempio queste molecole possono inibire le DNMTs legandosi al sito catalitico o ai domini di legame con cofattori, oppure possono associarsi alle isole CpG interferendo con la loro metilazione (Lee et al., 2005; Datta et al., 2009).

Ad oggi, la Food and Drug Administration (FDA) ha approvato Vidaza (5-azacitidina) e Decitabina (5-aza-2’-deossicitidina), due inibitori delle DNMTs analoghi dei nucleotidi, per il trattamento della sindrome mielodisplastica, che può portare allo sviluppo di leucemia mieloide acuta.

2.2 Inibitori delle HDACs

Gli enzimi HDACs rappresentano potenziali obiettivi farmacologici poiché, in molte forme di cancro, è stata riscontrata l’ipoacetilazione degli istoni, associata all’espressione aumentata e/o al reclutamento aberrante di tali enzimi. Numerosi inibitori delle istoni deacetilasi (HDACi), diretti contro istone deacetilasi delle classi I, II e IV zinco-dipendenti, sono stati isolati da fonti biologiche o sintetizzati appositamente. Una serie di requisiti rendono gli HDACi particolarmente adatti per l’uso clinico. Questi agenti, infatti, colpiscono selettivamente le cellule cancerose, mostrando una tossicità fino a dieci volte inferiore nelle cellule normali (Bolden et al., 2006), e possono intervenire su un ampio spettro di malattie neoplastiche, grazie al loro effetto pleiotropico e aspecifico.

Tuttavia, la mancanza di specificità d’azione nei confronti delle varie isoforme delle istone deacetilasi costituisce anche il maggior difetto degli HDACi disponibili. La maggioranza degli inibitori delle istone deacetilasi è stata progettata per determinare un blocco del riconoscimento del substrato, interferendo con il dominio catalitico dell’enzima, che presenta, però, un’alta conservazione tra le varie isoforme dei circa 400 residui amminoacidici che lo costituiscono (Kristensen et al., 2009).

Sulla base di queste premesse, diversi HDACi sono già oggetto di studi clinici di fase I/II per il trattamento di tumori solidi ed ematologici, anche in combinazione con altri farmaci antineoplastici. Nonostante i risultati incoraggianti finora ottenuti, la Food and

Drug Administration ha approvato solamente il Vorinostat (acido idrossamico suberoililide) e la Romidepsina (KF-228) per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T.

Gli HDACi si possono suddividere in 6 classi in base alla loro struttura chimica:

- *Acidi idrossamici*. La maggior parte delle molecole appartenenti a questo gruppo sono inibitori delle HDAC di classe I e II e mostrano un'alta potenza, agendo a concentrazioni micro e nano molarie *in vitro*. A questa categoria appartengono la tricostatina A (TSA), uno dei primi inibitori naturali delle HDACs ad essere stato individuato, e l'acido idrossamico suberoililide (SAHA), un composto di seconda generazione che, per l'elevato potere inibitorio e la capacità di indurre, *in vitro*, l'arresto della crescita, il differenziamento cellulare e/o l'apoptosi, è già utilizzato in *trials* clinici per il trattamento di tumori ematologici e non.
- *Peptidi ciclici*. A questo gruppo appartengono il depsipeptide FK-288, un prodotto naturale commercializzato con il nome di Romidepsina derivante dal *Chromobacterium violaceum*, e l'apicidina, entrambi in grado di inibire le HDACs a concentrazioni nanomolari, inducendo importanti effetti sulla proliferazione cellulare.
- *Acidi grassi a catena corta*. Fanno parte di questo gruppo il butirrato, il fenilbutirrato e l'acido valproico. Ad eccezione di quest'ultimo, questa classe di composti è caratterizzata da una breve emivita plasmatica, aspecificità e scarsa potenza dovuta alla breve catena alifatica che limita il contatto con la tasca catalitica delle HDACs. Per questi motivi la maggior parte dei composti non è adatta all'uso clinico.
- *Benzammidi*. Questa categoria include il composto MS-275, in grado di inibire le HDACs *in vitro* a concentrazioni micromolari e, quindi, la proliferazione cellulare.
- *Chetoni*. Gli unici inibitori appartenenti a questa classe sono una serie di composti naturali con una significativa attività inibitoria *in vitro*, come la trapoxina (TPX) A e B e la depudicina. Si tratta di inibitori di recente scoperta, che necessitano, quindi, di ulteriori studi per saggiare le loro capacità anti-tumorali.

- **Composti ibridi.** Questa categoria comprende composti semisintetici, nati dall'unione di peptidi ciclici e gruppi acidi idrossamici di TSA o SAHA, in grado di inibire reversibilmente le HDAC a concentrazioni nanomolari.

La risposta agli HDACi dipende dalla natura e dalla concentrazione del farmaco, dal tempo di esposizione e dal contesto cellulare. Gli HDACi, aumentando i livelli di acetilazione di proteine istoniche, possono mediare l'arresto della crescita, l'apoptosi, il differenziamento terminale e l'inibizione dei processi di invasione e proliferazione vascolare (Marks and Xu, 2009).

In molti tipi di tumori si è osservato un aumento dell'espressione proteica di p21, un inibitore delle chinasi ciclina dipendenti (anche in assenza del fattore di trascrizione p53 funzionante), delle cicline B e C e la repressione della trascrizione dei geni che codificano per le cicline A e D1, le quali normalmente, promuovono la progressione del ciclo cellulare. Questi eventi contribuiscono all'arresto del ciclo cellulare in fase G1/S (Marks and Xu, 2009). Altri geni modulati dagli HDACi sono coinvolti nella regolazione dell'apoptosi attivata attraverso la via mitocondriale e recettore mediata. In seguito al trattamento con gli HDACi, è stato osservato un aumento dell'espressione di geni codificanti per proteine proapoptotiche, come Trail, Fas, Bax, Bak, Bim, Bmf, Bik e/o una diminuzione di quelle antiapoptotiche, come Xiap, Bcl2 e survivina. L'inibizione delle istone deacetilasi favorisce l'apoptosi inducendo anche l'accumulo di ROS nelle cellule tumorali, attraverso l'aumento dell'espressione di TBP-2 (Thioredoxin Binding Protein), in grado di legare e inibire la proteina scavenger tioredoxina (Marks et Xu, 2009). Gli inibitori delle HDAC hanno dimostrato di essere potenti agenti angiostatici, sia *in vitro* che *in vivo*, attraverso la riduzione dell'espressione dei fattori proangiogenici HIF-1 e VEGF (Marks and Xu, 2009).

Poiché, da quanto osservato, gli HDACi costituiscono un gruppo di sostanze antitumorali promettenti, è di fondamentale importanza lo studio dei meccanismi d'azione e l'identificazione di marcatori che possano predire l'efficacia della risposta.

- **Acido valproico**

L'acido valproico (o valproato o VPA) è un acido grasso a catena ramificata a 8 atomi di carbonio, derivato dall'acido valerico, ottenuto, a sua volta, dalla pianta *Valeriana officinalis*. Tale composto è stato sintetizzato per la prima volta nel 1882. Dal 1963 è

utilizzato, in virtù del suo effetto anticonvulsivante e sedativo, come farmaco per il trattamento dell'epilessia e dei disturbi bipolari. Nel cervello umano, l'acido valproico potenzia l'attività del neurotrasmettitore inibitorio GABA (acido gamma amino butirrico) (Mesdjian et al., 1982), attenua l'eccitazione NMDA-mediata (Gean et al., 1994) e blocca i canali del Na^+ e del Ca^{2+} voltaggio dipendenti (VanDongen et al., 1986).

Negli anni '80-'90, alcuni studi hanno dimostrato che il VPA è in grado di ridurre la proliferazione e promuovere il differenziamento di diverse linee cellulari tumorali, principalmente di origine neuroectodermica e leucemica, destando un crescente interesse verso un suo potenziale utilizzo nella terapia antitumorale.

Sebbene la maggior parte degli studi preclinici come antitumorale si siano focalizzati sull'oncologia ematologica, l'interesse si sta estendendo anche ai tumori solidi, fra cui cancro del colon retto, tumore prostatico, cancro del seno, epatocarcinoma, neuroblastoma e glioma.

L'effetto antiproliferativo dell'acido valproico è stato mostrato inizialmente da Regan e colleghi nel 1985, che osservarono un decremento dell'indice mitotico in cellule murine di neuroblastoma e in cellule di glioma di ratto trattate con VPA (Regan et al., 1985). Successivamente, nel 1997, Cinatl J. e colleghi dimostrarono che l'acido valproico era in grado di inibire la proliferazione e indurre il differenziamento di cellule tumorali primitive di origine neuroectodermica, anche *in vivo* (Cinatl et al., 1997), mentre Gottlicher e colleghi hanno evidenziato la capacità del valproato di indurre il differenziamento di cellule progenitrici ematopoietiche trasformate in blasti leucemici, provenienti da pazienti con leucemia mieloide acuta (Gottlicher et al., 2001). Altri studi effettuati su linee cellulari di neuroblastoma (293T) e di teratocarcinoma (F9) hanno dimostrato che l'effetto anti-proliferativo e prodifferenziativo del VPA risulta strettamente associato alla sua capacità di inibire le istone deacetilasi (Gottlicher et al., 2001, Serrano et al., 1993). Questo farmaco, inibendo in maniera selettiva la classe I (sottoclassi Ia e Ib) e la classe II (sottoclasse IIa) delle HDACs e, di conseguenza, inducendo l'iperacetilazione degli istoni H3 e H4 a livello di residui di lisina delle code N-terminali, è in grado di riattivare l'espressione di geni epigeneticamente silenziati nei tumori (Blaheta et al., 2005; Van Lint et al., 1996). In particolare il VPA è in grado di inibire l'attività catalitica delle HDACs di classe I e di promuovere la degradazione mediata dal proteasoma delle HDACs di classe II. Le proteine derivanti dalla trascrizione e traduzione dei geni di cui, a seguito della somministrazione del farmaco,

viene alterata l'espressione sembrano essere coinvolte in processi cellulari di particolare importanza, come il controllo della progressione nel ciclo cellulare, il differenziamento, il riparo del DNA e l'apoptosi (Rosato et al., 2003; Savickiene et al., 2006; Chateauvieux et al., 2010). L'acido valproico ha mostrato un potente effetto antineoplastico in una vasta gamma di modelli tumorali sia *in vivo* che *in vitro*, modulando diversi meccanismi tra i quali l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi, l'angiogenesi, la metastatizzazione e il differenziamento cellulare.

Studi su linee cellulari di carcinoma endometriale, di mieloma e di carcinoma tiroideo hanno documentato un arresto del ciclo cellulare nella fase G0/G1, causato dall'incremento dell'espressione di p21 e p27 e dalla riduzione dei livelli di ciclina A e D1, indotti dalla somministrazione di valproato (Takai et al., 2004; Catalano et al., 2005; Kaiser et al., 2006).

Recenti studi hanno confermato la capacità del VPA di indurre apoptosi in linee cellulari leucemiche umane (*lineage* T, B e mieloidi) sia attraverso la via mitocondriale e, quindi, il rilascio del citocromo C, sia attraverso l'attivazione delle caspasi 3, 8 e 9 (Kawagoe et al., 2002). Il pre-trattamento della linea cellulare leucemica MV4-11 con un inibitore delle caspasi, causa la perdita degli eventi apoptotici nucleari indotti dal VPA, come la condensazione della cromatina e la frammentazione del DNA, senza, però, bloccare l'esposizione della fosfatidilserina sulla superficie cellulare (Phillips et al., 2003). Questi risultati lasciano presupporre, quindi, che l'acido valproico in tali tipi di tumore possa attivare due diverse vie di segnalazione apoptotica: una caspasi-dipendente, e l'altra caspasi-indipendente. Altri studi hanno dimostrato che il VPA induce apoptosi anche in linee di carcinoma prostatico, epatico e tiroideo, attraverso l'aumento dell'espressione di fattori pro-apoptotici, come Bik, e la diminuzione di proteine anti-apoptotiche, come Bcl-2 e Bcl-XL (Angelucci et al., 2006; Armeanu et al., 2005; Shen et al., 2005).

E' stata registrata, inoltre, un'attività anti-angiogenica del VPA con inibizione della proliferazione e della migrazione delle cellule endoteliali (Michaelis et al., 2004). La somministrazione di VPA in cellule di neuroblastoma ha evidenziato un aumento della produzione di fattori antiangiogenici, come la trombospondina e l'attivina A (Cinatl et al., 2002).

Uno studio di Benítez e colleghi del 2008 ha evidenziato che la somministrazione di acido valproico in cellule di astrocitoma inibisce la proliferazione cellulare ed aumenta, in modo tempo e dose dipendente, la mortalità, inducendo anche il differenziamento;

quest'ultimo effetto sembra essere associato ad arresto della crescita e a ridotta migrazione cellulare, probabilmente attribuibili all'attivazione della ciclina nucleare D3 (Bacon et al., 2002). Lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato che il trattamento, protratto per 6 giorni, della linea C6 di glioma con VPA 3 mM induce cambiamenti morfologici associati alla *down*-regolazione della proteina acida fibrillare della glia (GFAP), del fattore neurotrofico di derivazione gliale (GDNF) e del fattore neurotrofico di derivazione cerebrale (BDNF). La ridotta espressione del GDNF, implicato nella migrazione e proliferazione delle cellule di glioma, priverebbe, così, le cellule tumorali della loro invasività e capacità di infiltrare il parenchima cerebrale.

L'espressione del marker neuronale β -III tubulina, al contrario, risulta incrementata in seguito al trattamento con il farmaco. Sembra che tali effetti possano essere attribuiti specificatamente al VPA, poiché il trattamento con forskolina (FSK), farmaco noto per la sua capacità di indurre il differenziamento astrocitico (Salero-Coca et al., 1995; Segovia et al., 1994; Segovia et al., 1998), non ha condotto all'espressione di marker neuronali, né ad una crescita simil neuritica.

L'acido valproico, rispetto ad altri agenti farmacologici noti per la loro capacità prodifferenziativa, presenta più vantaggi poiché, essendo utilizzato nella pratica clinica da molti anni, se ne conoscono già farmacologia e tossicità. L'analisi delle cinetiche di accumulo del VPA, in pazienti con disordini bipolari, ha dimostrato che il livello stabile della concentrazione di VPA nel siero varia da 50 a 100 mg/ml (Sackellares et al., 1981; Vasudev et al., 2001).

Il VPA può essere somministrato oralmente e presenta un'emivita pari a 9-18 ore (3-4 volte più lunga rispetto ad altri agenti prodifferenziativi); è, inoltre, in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, esibendo scarsi effetti collaterali negli adulti, anche con livelli di farmaco nel siero eccedenti il range terapeutico standard. Infine, le dosi quotidiane di VPA richieste per raggiungere nel siero dei pazienti il livello terapeutico (20-30 mg/kg) risultano moderate rispetto a quelle richieste per altri HDACs disponibili.

Il VPA, quindi, grazie al suo ridotto profilo di tossicità, anche in trattamenti di lunga durata, e al suo potente effetto antitumorale, dimostrato sia *in vitro* che *in vivo* in molteplici studi preclinici, potrebbe essere impiegato con successo nel trattamento mono o politerapico di diversi tipi di tumori. In virtù del suo effetto differenziativo, questo farmaco potrebbe essere utilizzato per indurre il differenziamento nelle cellule staminali tumorali, al fine di bloccare la proliferazione, eliminando, così, l'unica

popolazione cellulare in grado di originare e propagare il tumore. La sua attività di inibitore deacetilasico potrebbe contribuire alla riattivazione di geni importanti per il differenziamento e di geni oncosoppressori, provocando così una riduzione dell'aggressività tumorale e un'eventuale sensibilizzazione ai farmaci chemioterapici.

2.3 Inibitori e attivatori delle Sirtuine

Le sirtuine sono proteine altamente conservate della classe III delle istone deacetilasi, aventi attività deacetilasica NAD-dipendente o ADP-ribosiltransferasica. Nei mammiferi sono presenti 7 isoforme di sirtuine (SIRT1-SIRT7) che differiscono per localizzazione subcellulare, funzione e substrati.

La sirtuina umana più studiata e caratterizzata è SIRT1 (omologo di Sir2 di lievito), la cui elevata espressione in situazioni di restrizione calorica (CR) è stata associata, in modelli murini, ad un aumento dell'aspettativa di vita del 70% e a un'inibizione dei processi di invecchiamento (Cohen et al., 2004). I meccanismi molecolari alla base degli effetti benefici della CR sulla durata della vita comprendono l'attivazione di recettori per fattori di crescita insulino-simili, come IGF1, e di *pathways* intracellulari mediati da AKT e l'induzione dell'espressione di SIRT1 (Fontana et al., 2010; Kenyon et al., 2010; Rodgers et al., 2005). SIRT1, la cui espressione è indotta in ratto e uomo aventi, rispettivamente, il 40% e il 25% di riduzione calorica (Cohen et al., 2004), regola, grazie alla sua attività deacetilasica, l'espressione di geni coinvolti in meccanismi molecolari responsabili degli effetti della CR sulla longevità (Picard et al., 2004; Wakeling et al., 2009; Holness et al., 2010).

Contrariamente alle istone deacetilasi di classe I e II, SIRT1 richiede la presenza di NAD⁺ come cofattore: SIRT1, infatti, rimuove il gruppo acetile dalle proteine substrato e lo trasferisce a NAD⁺, generando due metaboliti: 2'-O-acetil-ADP-ribosio e nicotinammide (NAM). La sua attività non viene bloccata dagli inibitori delle istone deacetilasi, precedentemente descritti, diretti contro HDACs zinco-dipendenti.

SIRT1 può deacetilare numerose proteine istoniche in corrispondenza di specifici residui di lisina, come H1 (K26), H3 (K9) e H4 (K16), e diverse proteine non istoniche, come oncosoppressori (p53, p73, pTEN), fattori di trascrizione, proteine coinvolte in vie di segnalazione intracellulari (β -catenin, RelA/p65) e recettori nucleari (PPAR γ , ER α , AR, LXR), suggerendo un ruolo più complesso di questo enzima.

Dato il numero elevato di potenziali substrati e la variabilità dei dati relativi ai livelli di espressione di SIRT1 nei tumori, elevata nei tumori della prostata, nel carcinoma epatocellulare, nella leucemia mieloide acuta, nel tumore del colon-retto (Wang et al., 2011) e ridotta in glioblastoma, tumore dell'ovaio e della vescica (Wang et al., 2008; Kabra et al., 2009), non è ancora chiaro se tale enzima agisca come oncosoppressore o oncogene [Fig.4].

La prima prova del fatto che SIRT1 possa agire da oncogene è che, deacetilando p53 in corrispondenza del residuo di lisina 382, è in grado di inibire l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi innescati dall'oncosoppressore in risposta a danni al DNA o a stress ossidativo (Vaziri et al., 2001; Luo et al., 2001). L'*over*-espressione di SIRT1, inoltre, causa il silenziamento epigenetico di molti oncosoppressori, come i fattori di trascrizione forkhead di classe O (FOXO) (Motta et al., 2004), che inducono l'espressione di geni codificanti proteine implicate nell'inibizione del ciclo cellulare e proteine proapoptotiche, quali p73 (Dai et al., 2007), RB (Wong et al., 2007), SFRP1, SFRP2, CDH1, MLH1 (Pruitt et al., 2006) e WRN (Li et al., 2008), e proteine coinvolte nella riparazione di danni al DNA, come Ku70 (Cohen et al., 2004). O'Hagan e colleghi hanno fornito un'interessante spiegazione del coinvolgimento di SIRT1 nel silenziamento genico e nell'aberrante metilazione delle isole CpG, eventi responsabili dell'inizio e del mantenimento del processo di carcinogenesi. Hanno, infatti, dimostrato che SIRT1, reclutato in corrispondenza di danni al DNA causati dall'esposizione a carcinogeni e/o da stati di infiammazione cronica, è in grado di richiamare DNMT1 e DNMT3B, che causano l'aberrante metilazione delle isole CpG e il silenziamento di geni oncosoppressori (O'Hagan et al., 2008). L'*over*-espressione di SIRT1 può contribuire a spiegare, quindi, il profilo ipermetilato delle isole CpG nei tumori e l'instabilità dei microsatelliti (Nosho et al., 2009).

L'espressione e/o attività di SIRT1 può essere, a sua volta, regolata da oncosoppressori, come HIC1 (Hypermethylated in cancer-1), che codifica per un repressore trascrizionale in grado di interagire con p53. HIC1 e SIRT1 costituiscono un complesso di repressione trascrizionale che, legandosi al promotore di SIRT1, ne reprime la trascrizione. Poiché p53 è in grado di trans-attivare HIC1, è stata proposta l'esistenza di un *loop* regolatorio che coinvolge p53, HIC1 e SIRT1 (Chen et al., 2005). L'inattivazione di HIC1 causa un incremento dell'espressione di SIRT1, che deacetila e inattiva p53, consentendo alle cellule di sfuggire al processo apoptotico e sopravvivere anche in seguito a danni al DNA. È stato osservato che, in situazioni normali, HIC1 è attivamente espresso e,

reprimendo la trascrizione di SIRT1, mantiene p53 in uno stato attivo, che arresta il ciclo cellulare inducendo apoptosi in risposta a danni al DNA, e trans-attiva HIC1 stesso. Nelle cellule tumorali, in cui il meccanismo di riparo del DNA risulta non correttamente funzionante, la riduzione dell'espressione di p53 comporta una diminuzione dell'espressione di HIC1 e un aumento dell'espressione di SIRT1, che causa la deacetilazione e l'inattivazione di p53. Inoltre, il silenziamento epigenetico di HIC1, causato dall'ipermetilazione del promotore di tale gene, durante l'invecchiamento, causa un aumento dell'espressione di SIRT1 e, di conseguenza, un incremento del rischio di sviluppare tumori nei mammiferi (Chen et al., 2005)

In accordo con questi dati e in seguito all'osservazione che il silenziamento di SIRT1, attraverso l'uso di specifici siRNA, induce *in vitro* l'arresto della crescita di cellule tumorali (Peck et al., 2010), sono stati studiati e sviluppati diversi inibitori specifici di SIRT1 (nicotinammide, sirtinol, cambinol) (Ota et al., 2006; Heltweg et al., 2006) .

Molti studi recenti hanno rivelato che SIRT1 può agire anche da oncosoppressore. Ad esempio, Firestein e colleghi nel 2008 hanno dimostrato che l'aumento di espressione di SIRT1 in topi APC^{min/+} riduce la formazione di polipi, potenziali precursori del tumore del colon-retto, grazie alla capacità di SIRT1 di deacetilare e indurre la localizzazione citoplasmatica della forma oncogenica nucleare della β -catenina.

E' stato inoltre dimostrato che SIRT1 è in grado di deacetilare la subunità RelA/p65 di Nf-kB, rendendo le cellule sensibili all'apoptosi indotta da TNF α (Yeung et al., 2004), e le lisine in posizione 9 degli istoni H3 situati in corrispondenza del promotore del gene codificante per Survivina, inibendo l'espressione di questa proteina antiapoptotica (Wang et al., 2008).

SIRT1, infine, svolge un ruolo fondamentale nella riparazione dei danni al DNA e nel mantenimento della stabilità genomica. Wang e colleghi nel 2008 hanno dimostrato che embrioni di topo Sirt1^{-/-} muoiono a metà gestazione a causa di un'aumentata acetilazione degli istoni H3 e H4 in corrispondenza, rispettivamente, delle lisine 9 e 16, che comporta anomalie nella condensazione cromatinica, divisioni mitotiche aberranti, aneuploidie cromosomiche e alterazioni strutturali.

Normalmente SIRT1 si trova legata a sequenze altamente ripetute di DNA, contribuendo al silenziamento di geni, la cui espressione è correlata all'età (Oberdoerffer et al., 2008). In caso di danni al DNA, SIRT1 si sposta in corrispondenza dei *double strand breaks* (DBSs) dove recluta proteine necessarie per la riparazione,

come BRCA1, RAD51, NBS1. Bassi livelli di espressione di SIRT1, quindi, causano un'espressione aberrante di geni legati al processo di invecchiamento e una diminuzione della capacità delle cellule di riparare i DSBs, con conseguente instabilità genomica (Wang et al., 2008).

La possibile funzione di SIRT1 come oncosoppressore ha portato all'individuazione o alla sintesi di composti in grado di attivarla. Alcune sostanze naturali in grado di attivare SIRT1 sono i polifenoli, tra i quali vi è il resveratrolo.

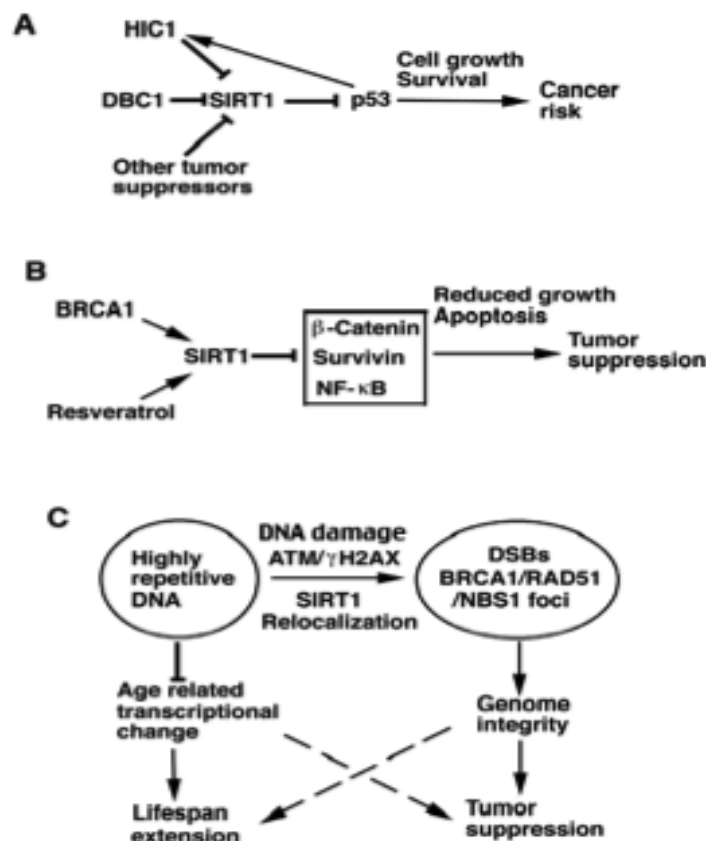


Figura 4. Rappresentazione schematica dei meccanismi attraverso i quali SIRT1 può agire da oncogene o da oncosoppressore. **A.** SIRT1, deacetilando e inattivando p53, promuove il processo di tumorigenesi. L'attività di SIRT1 è negativamente regolata da alcuni oncosoppressori, come HIC1 e DBC1. **B.** SIRT1, che può essere attivato dal resveratrolo o da BRCA1, agisce questa volta da oncosoppressore, inibendo l'espressione o l'attività di molti oncogeni. **C.** In risposta a danni al DNA, SIRT1 favorisce la riparazione del DNA e l'integrità genomica (Deng, 2009)

- **Resveratrolo**

Il resveratrolo è uno dei più potenti attivatori naturali, *in vivo* e *in vitro*, di SIRT1. Il resveratrolo, riproducendo gli stessi effetti della restrizione calorica a livello di variazioni della trascrizione genica e dell'attivazione di *pathways* intracellulari (Barger et al., 2008; Pearson et al., 2008; Smith et al., 2009), induce l'espressione di SIRT1 (Wang et al., 2009) e ne favorisce l'attività deacetilasica [Fig.5]. L'incremento dell'attività deacetilasica di SIRT1 è stato dimostrato dapprima *in vitro*, attraverso un test che prevede l'utilizzo di un peptide acetilato fluorogenico derivato da p53, substrato naturale di SIRT1 (Howitz et al., 2003); in seguito, questo evento è stato confermato anche in linee cellulari utilizzando il substrato endogeno p53 (Milne et al., 2007; Hwang et al., 2010). Dopo aver valutato l'effetto del resveratrolo sull'attività enzimatica di SIRT1 umana attraverso la spettrometria di massa, il grado di deacetilazione di p53 in cellule U2OS (linea cellulare trasformata proveniente da tessuto osseo affetto da osteosarcoma), rilevato mediante la tecnica *in-cell western*, ha permesso di misurare l'attività cellulare. Recenti studi hanno dimostrato che il resveratrolo attiva SIRT1 indirettamente, attraverso la mediazione di AMPK (Canto et al., 2009; Canto et al., 2010; Houtkooper et al., 2010).

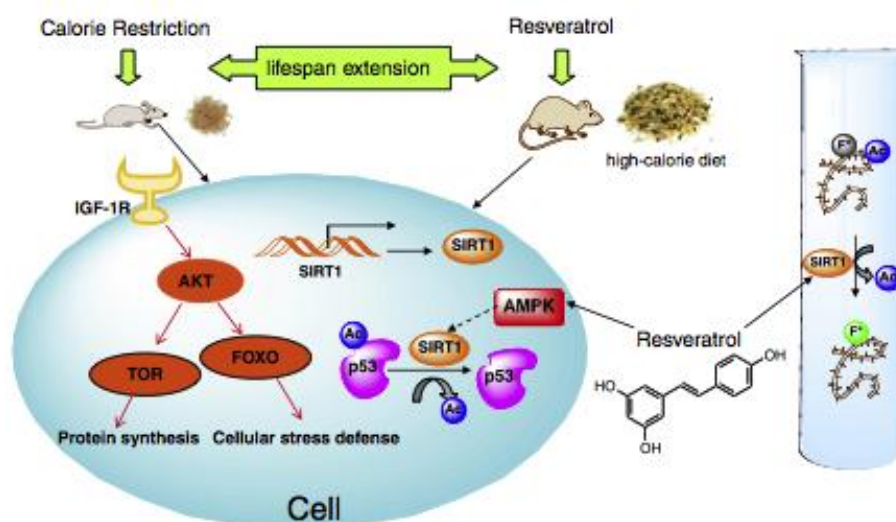


Figura 5. Rappresentazione schematica degli effetti di restrizione calorica e resveratrolo in relazione all'attivazione di SIRT1 (Hu et al., 2011)

Il resveratrolo (RSV, 3,5,4'-triidrossi-trans-stilbene), un fenolo non flavonoide, è una delle fitoalessine prodotte naturalmente da molte piante per difendersi da agenti patogeni quali batteri e funghi. Abbondante soprattutto nella buccia dell'acino d'uva (50–100 µg di RSV per grammo di buccia d'uva), ma presente anche nei mirtilli, nelle arachidi, nelle more e in più di 70 specie di piante (Baur et al., 2006), il resveratrolo è stato isolato, per la prima volta, dalle radici del *Veratrum grandiflorum* e del *Polygonum cuspidatum*, componente di un'antica preparazione orientale ("Ko-jo-kon"), utilizzata come antiinfiammatorio e cura delle malattie cardiovascolari (Bauer et al., 2006).

L'interesse nei confronti del resveratrolo è nato intorno agli anni '90 nel tentativo di spiegare il "paradosso francese". Tale termine, coniato da Serge Renaud nel 1992, uno studioso dell'Università di Bordeaux, indica il fenomeno per il quale in Francia, nonostante l'alto consumo di alimenti ricchi di acidi grassi saturi, l'incidenza di mortalità per malattie cardiovascolari è inferiore rispetto ad altri Paesi dieteticamente comparabili (Renaud et al., 1992). In seguito a tale osservazione è stato ipotizzato che l'apparente effetto cardioprotettivo fosse dovuto al consumo regolare di dosi moderate di vino rosso, ricco di resveratrolo (Kopp et al., 1998). L'RSV, quindi, è stato inizialmente conosciuto e studiato per le sue proprietà antiossidanti, anti-aging, anticoagulanti, antiinfiammatorie e vasorilassanti.

L'interesse nei suoi confronti è cresciuto in modo considerevole quando uno studio di Jang e collaboratori, pubblicato nel 1997, ha dimostrato la proprietà antineoplastica di tale composto, ovvero la capacità di inibire, *in vitro* e *in vivo*, le tre fasi principali del processo di carcinogenesi: iniziazione, promozione e progressione (Jang et al., 1997).

Lo stesso studio ha verificato, inoltre, che la somministrazione topica di resveratrolo era in grado di prevenire lo sviluppo di tumori della pelle in topi CD-1 di sesso femminile, trattati con DMBA (7,12-dimethylbenz[a]antracene) e TPA (12-O-teradecanoylphorbol-13-acetate), due potenti cancerogeni chimici (Jang et al., 1997). Studi successivi hanno confermato le proprietà chemiopreventive e chemioterapiche del resveratrolo (Kundu et al., 2004; Aggarwal et al., 2004; Shankar et al., 2007; Fulda et al., 2006; Garg et al., 2005). Il resveratrolo è in grado di inibire la fase iniziale di cancerogenesi grazie alla sua potente azione antiossidante, superiore a quella di altre molecole note, come la vitamina C e la vitamina E. Lo stress ossidativo, caratterizzato da un'alterazione dell'omeostasi cellulare dovuta all'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno

(ROS) e/o ad alterazioni di meccanismi cellulari scavenger, comporta danni a macromolecole e DNA e costituisce una delle cause d'insorgenza di neoplasie. Il resveratrolo agisce da *scavenger* dei radicali liberi ed è in grado di rigenerare antiossidanti endogeni, come il glutathione (GSH), esaurito, ad esempio, dal fumo di sigaretta, e di promuovere l'attività di enzimi antiossidanti e detossificanti di fase II, come glutathione S-transferasi (GST), glutathione perossidasi (GPx), NADPH chinone ossido reduttasi (NQO) ed eme ossigenasi 1 (Chen et al., 2005; Juan et al., 2005; Kode et al., 2008). Uno dei meccanismi attraverso i quali il resveratrolo esercita il suo effetto chemiopreventivo è la regolazione dell'attivazione dei cancerogeni e l'attivazione di enzimi detossificanti (Kundu et al., 2004; Baur et al., 2006). Molte sostanze chimiche cancerogene vengono sottoposte a metabolismo ossidativo da parte degli enzimi di fase I, in particolare quelli che appartengono alla superfamiglia del citocromo P450 (CYP), per essere convertiti in intermedi polari, che vengono successivamente eliminati tramite reazioni di coniugazione catalizzate da enzimi di fase II. In assenza di enzimi di fase II correttamente funzionanti, i cancerogeni metabolicamente attivi hanno maggiori probabilità di intaccare il DNA cellulare, avviando, così, il processo di tumorigenesi. L'inibizione mirata dell'attivazione metabolica e l'induzione di enzimi disintossicanti sono considerate una strategia fondamentale per bloccare la fase iniziale della carcinogenesi multi-step. Molti studi hanno dimostrato che il resveratrolo è in grado, non solo di attivare enzimi di fase II, ma anche di inibire enzimi del CYP, coinvolti nell'attivazione metabolica di cancerogeni, come gli idrocarburi poliaromatici (IPA). La transattivazione di *CYP1A1*, che codifica un enzima coinvolto nell'attivazione metabolica di un ampio spettro di IPA, richiede il legame della forma attiva del recettore arilico per gli idrocarburi (AhR) al segmento promotore del gene. Il resveratrolo inibisce AhR attraverso due possibili meccanismi: il blocco della conversione del recettore dalla forma citoplasmatica alla forma nucleare, in grado di legare il DNA, e la soppressione dell'interazione di AhR con il macchinario trascrizionale in corrispondenza del promotore del gene *CYP1A1* (Gusman et al., 2001). Il resveratrolo è in grado, non solo di bloccare la trascrizione di enzimi del CYP, ma anche di inibirne l'attivazione. Un altro membro della famiglia CYP è CYP19, conosciuto anche come aromatasi, un enzima limitante nel processo di biosintesi degli estrogeni. Dal momento che gli estrogeni svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo del cancro al seno, l'effetto chemiopreventivo del resveratrolo è dato dalla sua capacità di inibire l'attività di CYP19, come dimostrato in uno studio effettuato su

cellule MCF-7 (Wang et al., 2006). Recenti studi hanno confermato la proprietà anti-estrogenica del resveratrolo, rivelando il legame di tale composto con il sito attivo dell'aromatasi (Neves et al., 2007).

Il resveratrolo ostacola anche la promozione tumorale grazie all'attività antiinfiammatoria. Il resveratrolo, infatti, inibisce l'espressione di mediatori dell'infiammazione, come la ciclossigenasi 2 (Martinez et al., 2000; Murakami et al., 2003; Kundu et al., 2006), che converte l'acido arachidonico in prostaglandine, l'ossido nitrico sintasi inducibile (Tsai et al., 1999) e le citochine proinfiammatorie (Kowalski et al., 2005; Estrov et al., 2003; Li et al., 2007), in grado di promuovere il processo di cancerogenesi (Perwez Hussain et al., 2007; Kundu et al., 2005).

Il resveratrolo, inoltre, blocca il *pathway* di segnalazione intracellulare mediato da NF- κ B, coinvolto in processi infiammatori, che, essendo attivato in modo aberrante nel cancro, promuove la carcinogenesi, inducendo l'espressione di geni che favoriscono la sopravvivenza, la proliferazione e la migrazione di cellule tumorali (Staudt et al., 2010; Kucharczak et al., 2003).

Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che il resveratrolo è in grado di bloccare il fattore di trascrizione NF- κ B, inibendo la localizzazione nucleare della subunità p65 o la degradazione di I κ B α , che mantiene NF- κ B nel citoplasma (Kundu et al., 2006).

In alternativa, il resveratrolo, attivando SIRT1, inibisce l'espressione di geni *target* di NF- κ B mediante la deacetilazione di RelA/p65 in corrispondenza della lisina 310 (Jang et al., 2007; Yeung et al., 2004).

Il resveratrolo, infine, ostacola la progressione tumorale, inibendo la proliferazione cellulare, l'angiogenesi e la migrazione di cellule cancerose in grado di originare metastasi.

L'effetto anti-proliferativo del resveratrolo è stato attribuito innanzitutto alla sua capacità di bloccare la sintesi del DNA (Fontecave et al., 1998) e arrestare, in diverse fasi, il ciclo cellulare (Gusman et al., 2001), inibendo l'espressione di chinasi ciclina-dipendenti (Cdk2, Cdk4 e Cdk6) e di cicline (ciclina D1 e ciclina D2) e aumentando l'espressione di p21^{WAF1/CIP1} e p53 (Reagan-Shaw et al., 2004).

Alcuni studi hanno dimostrato che RSV è in grado di indurre apoptosi *in vitro* e *in vivo* attraverso l'attivazione sia della via estrinseca che di quella intrinseca. In un primo studio di Clement e colleghi del 1998, era stato osservato che il resveratrolo induceva l'apoptosi in cellule di leucemia promielocitica (HL-60) o di cancro al seno (T47D)

mediante l'attivazione del *pathway* di CD95, modulando, esclusivamente nelle cellule tumorali, i livelli di FAS e del suo ligando (FAS-L). In successivi lavori eseguiti su cellule di cancro del colon è stato dimostrato che RSV, in realtà, non altera i livelli di FAS e FAS-L, ma causa una ridistribuzione dei recettori di superficie, come CD95 e i recettori di morte DR4 e DR5, che si dispongono in *rafts* della membrana plasmatica (Delmas et al., 2003; Delams et al., 2004). Il resveratrolo è in grado di indurre anche la via intrinseca apoptotica attraverso l'attivazione di p53, dovuta all'interazione con l'integrina di membrana $\alpha V\beta 3$, e della caspasi effettrice 3, la stimolazione del rilascio del citocromo c da parte del mitocondrio e della frammentazione del nucleo, l'*up*-regolazione di molecole proapoptotiche, come Bax, e la *down*-regolazione di molecole antiapoptotiche, come Bcl2 (Zhou et al., 2005; Gusman et al., 2001; Kim et al., 2004). Il resveratrolo, inoltre, può attivare caspasi effettrici, causando apoptosi indipendentemente dall'attivazione di recettori di morte o della via mitocondriale (Mohan et al., 2006).

In uno studio di Suh e colleghi del 1995, è stata dimostrata la capacità del resveratrolo di indurre il differenziamento terminale in cellule tumorali di leucemia promielocitica (HL-60). In condizioni di coltura normali le cellule HL-60 hanno un potenziale proliferativo illimitato. Il resveratrolo induce, in modo dose-dipendente, un differenziamento verso un fenotipo granulocitico o macrofagico, avente capacità proliferativa limitata.

Il resveratrolo è in grado di bloccare la progressione tumorale inibendo la neoangiogenesi. I tumori solidi presentano al loro interno un ambiente ipossico, dovuto all'aumento delle attività metaboliche e all'elevato consumo di ossigeno da parte delle cellule in rapida proliferazione (Liao et al., 2007; Lopez-Lazaro et al., 2006), che induce l'espressione, regolata dall' *Hipoxic Inducible Factor* (HIF), di fattori responsabili del processo di neoangiogenesi come il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), il recettore per VEGF, IL-8, iNOS e le angiopoietine (Hickey et al., 2006; Pollard et al., 2004).

E' stato dimostrato che il resveratrolo è in grado di inibire l'espressione di HIF-1 α e VEGF in cellule del cancro ovarico (OVCAR-3) e del carcinoma squamoso della lingua (SCC-9) attraverso l'inibizione di Akt, delle MAP chinasi o la degradazione di HIF-1 α da parte del proteasoma (Cao et al., 2004; Zhang et al., 2005). RSV inibisce anche la tirosin chinasi Src, che, in risposta all'elevata quantità di ROS, in prossimità dell'area

interessata dalla neoplasia, fosforila la caderina endotelio-vascolare (VE-caderina), causando un aumento della migrazione delle cellule endoteliali e la formazione di nuovi vasi. L'effetto antiangiogenico del resveratrolo in glioma ad alto grado di malignità, caratterizzato da un'estesa proliferazione vascolare, è stato dimostrato *in vitro* e *in vivo*. La somministrazione di 40 mg/Kg/giorno di RSV per 4 settimane in ratti affetti da tale neoplasia ha causato una diminuzione della densità vascolare e, quindi, della velocità di crescita del tumore (Chen et al., 2006).

Il resveratrolo, è in grado, inoltre, di ridurre l'invasione tumorale, la migrazione cellulare e la formazione di metastasi attraverso l'inibizione dell'espressione o dell'attività di metalloproteasi (MMPs), come MMP-2 e MMP-9 (osservata in studi *in vitro* eseguiti su cellule di glioblastoma, mieloma multiplo, tumore del seno ed epatocarcinoma), (Sun et al., 2006; Tang et al., 2008; Yu et al., 2007; Gagliano et al., 2005) ma anche la *down*-regolazione dose-dipendente di proteine secrete acide ricche in cisteine (SPARC), responsabili del rimodellamento della matrice extracellulare (osservata, ad esempio, in glioblastoma) (Gagliano et al., 2005).

L'uso del resveratrolo, come adiuvante in combinazione con agenti chemioterapici, può rendere le cellule tumorali chemioresistenti più sensibili all'azione dei farmaci tradizionali, riducendo al minimo gli effetti collaterali derivanti dalla terapia convenzionale (Garg et al., 2005). Il resveratrolo, usato in combinazione con bortezomib e thalidomide, etoposide e cisplatino e doxorubicina, nel trattamento, rispettivamente, di cellule di mieloma multiplo, cancro del colon-retto e tumore dell'ovaio, induce arresto della crescita e apoptosi (Bhardwaj et al., 2007; Hwang et al., 2007; Rezk et al., 2006). E' stato dimostrato, inoltre, che il resveratrolo è in grado di inibire la funzione della glicoproteina P, una pompa di efflusso che espelle i chemioterapici dalle cellule tumorali, aumentando, ad esempio, la concentrazione di daunorubicina in cellule di carcinoma epidermoide (KB-C2) chemioresistenti (Nabekura et al., 2005).

Il resveratrolo, grazie alle sue proprietà chemiopreventive e chemioterapiche potrebbe essere impegnato nella cura di diverse tipologie di tumori. In previsione di un eventuale impiego del resveratrolo in clinica, sono stati condotti diversi studi al fine di determinare la biodisponibilità e la farmacocinetica.

Nell'uomo il resveratrolo, somministrato per via orale, viene rapidamente metabolizzato dagli enzimi di fase II nel fegato, dove viene coniugato con solfato o acido glucuronico (Wenzel et al., 2005); il 70% del resveratrolo somministrato (fino a 25 mg) viene

assorbito con un picco di concentrazione plasmatica di circa 2 μM e un'emivita compresa tra 6,5 e 14,9 ore (Walle et al., 2004). Nel plasma il resveratrolo coniugato, si lega alle lipoproteine o all'albumina, che facilitano l'*uptake* da parte delle cellule (Jannin et al., 2004). Un primo studio condotto su gerbilli ha mostrato la capacità del RSV di attraversare la barriera emato-encefalica, supportando l'ipotesi di un suo possibile utilizzo nella cura dei tumori cerebrali (Wang et al., 2002).

Un recente trial clinico di fase I ha rivelato che il consumo di resveratrolo (5 mg) non causa effetti collaterali nei volontari sani, ma il picco massimo di composto raggiunto nel plasma (2,4 μM) è al di sotto della concentrazione minima dimostrata essere necessaria per esercitare l'azione antitumorale in linee cellulari (Boockock et al., 2007). Per questo sono necessari ulteriori studi al fine di migliorare la biodisponibilità del resveratrolo, modulando il suo metabolismo e individuando possibili interazioni con altri elementi della dieta.

3. I tumori cerebrali

I tumori cerebrali sono rappresentati da neoplasie maligne e benigne che si sviluppano nel sistema nervoso centrale (SNC); sono detti primari se originanti dal sistema nervoso centrale, per lo più dal tessuto neuroepiteliale (neuroni e cellule gliali) e dalle meningi, secondari se metastasi di tumori che si sono sviluppati in altri organi.

I tumori cerebrali maligni rappresentano circa il 2% di tutte le affezioni tumorali di natura maligna degli adulti. Dagli studi statistici effettuati, si evidenzia che ogni anno negli Stati Uniti vengono diagnosticati 22.000 nuovi casi e che l'incidenza di tali tumori tende ad essere superiore nei Paesi altamente industrializzati rispetto a quelli in via di sviluppo; inoltre, le popolazioni caucasiche sono colpite più frequentemente delle popolazioni di origine africana o asiatica (Jemal et al., 2011; Gu et al., 2009).

Lo schema pubblicato dalla World Health Organization (WHO) nel 2007 permette di classificare i tumori del SNC in diversi istotipi in base alle loro caratteristiche istologiche e al tipo di cellula prevalente all'interno della lesione neoplastica (Louis et al., 2007) [Tab.1]. I tumori cerebrali si distinguono in forme neoplastiche neuronali o gliali; queste ultime, definite genericamente "gliomi", costituiscono circa il 78% di tutti i tumori cerebrali e sono la più comune neoplasia intracranica degli adulti. L'eziologia

dei tumori gliali è ancora poco conosciuta: l'unico fattore di rischio associato in modo inequivocabile alla loro comparsa è l'esposizione a dosi terapeutiche di radiazioni ionizzanti. Alcuni studi suggeriscono l'ipotesi di un'aumentata incidenza dei gliomi in relazione alla dieta, alle allergie, alle infezioni virali, all'esposizione occupazionale a determinati cancerogeni chimici (come piombo, arsenico, mercurio e cadmio) e a campi elettromagnetici. Tuttavia per nessuno di questi fattori è stata provata una forte correlazione causale con tale tipologia di tumore (Ohgaki and Kleihues, 2005).

La maggior parte dei gliomi maligni si manifesta sporadicamente: solo nel 5% dei pazienti è stata riscontrata una predisposizione familiare. In alcuni casi, tali tumori risultano essere associati a sindromi genetiche rare, come la sindrome di Li-Fraumeni, la neurofibromatosi di tipo 1 e 2 e la sindrome di Turcot (Wen and Kesari, 2008).

I gliomi possono essere suddivisi in sottoclassi a seconda che le cellule principali siano di carattere astrocitico, oligodendrocitico o ependimale (Louis et al., 2007).

Gli astrocitomi sono la tipologia di glioma più comune, originano dagli astrociti che forniscono ai neuroni un supporto sia meccanico che trofico, concorrono alla formazione della barriera emato-encefalica, e regolano la sinaptogenesi attraverso il rilascio di fattori neuromodulatori (He and Sun, 2007). Gli astrocitomi si possono presentare in forma diffusa e localizzata. Le forme diffuse costituiscono il 75% delle neoplasie astrocitarie (astrocitoma, astrocitoma anaplastico e glioblastoma multiforme) e sono caratterizzate da prognosi negativa perché tendono a subire una progressiva trasformazione maligna e a infiltrare diffusamente il tessuto cerebrale circostante. Le forme localizzate sono caratterizzate da una ridotta capacità invasiva, una limitata capacità di crescita e una scarsa propensione alla trasformazione maligna (astrocitoma pilocitico, xantoastrocitoma pleomorfo e astrocitoma subependimale gigantocellulare).

Gli oligodendrogliomi rappresentano il 10-15% di tutti i gliomi e originano dagli oligodendrociti, che formano la mielina attorno agli assoni delle cellule nervose.

Gli ependimomi prendono origine dall'ependimocita, la cellula di rivestimento delle cavità ventricolari e del canale midollare, e la loro incidenza varia nelle casistiche riportate dal 2 al 6% in rapporto a tutti i gliomi; pur manifestandosi in ogni età, sono più frequenti nelle prime due decadi di vita e rappresentano circa il 10% di tutte le neoplasie cerebrali dell'infanzia e dell'adolescenza.

La malignità dei tumori cerebrali si definisce attraverso una scala di *grading* stabilita dalla WHO, che, rispondendo a precisi criteri istopatologici (anomalia nucleare, attività mitotica, proliferazione microvascolare e necrosi), assegna a ogni tipo tumorale un

grado compreso tra I e IV. Il grado I comprende lesioni tumorali benigne a basso potenziale proliferativo e, quindi, con possibilità di guarigione in seguito a resezione chirurgica. Le neoplasie di II grado, benigne o maligne, sono di natura infiltrativa e, nonostante il basso potenziale proliferativo, spesso recidivano come tumori a grado più alto. I tumori di grado III sono maligni e presentano un'attività mitotica elevata e anomalie nucleari. I pazienti con questa tipologia di tumore sono trattati con radiazioni e/o chemioterapia adiuvanti. Il grado IV designa le neoplasie maligne particolarmente aggressive, con elevata attività mitotica, capacità invasiva e prognosi negativa. Tale classificazione, pertanto, permette di definire il comportamento biologico della lesione tumorale, la prognosi del paziente e, di conseguenza, la scelta della terapia. (Louis et al., 2007)

	I	II	III	IV
Astrocytic tumours				
Subependymal giant cell astrocytoma	•			
Pilocytic astrocytoma	•			
Piloxyoid astrocytoma		•		
Diffuse astrocytoma		•		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		•		
Anaplastic astrocytoma			•	
Glioblastoma				•
Giant cell glioblastoma				•
Gliosarcoma				•
Oligodendroglial tumours				
Oligodendroglioma		•		
Anaplastic oligodendroglioma			•	
Oligoastrocytic tumours				
Oligoastrocytoma		•		
Anaplastic oligoastrocytoma			•	
Ependymal tumours				
Subependymoma	•			
Myxopapillary ependymoma	•			
Ependymoma		•		
Anaplastic ependymoma			•	
Choroid plexus tumours				
Choroid plexus papilloma	•			
Atypical choroid plexus papilloma		•		
Choroid plexus carcinoma			•	
Other neuroepithelial tumours				
Angiocentric glioma	•			
Chordoid glioma of the third ventricle		•		
Neuronal and mixed neuronal-glial tumours				
Gangliocytoma	•			
Ganglioglioma	•			
Anaplastic ganglioglioma			•	
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	•			
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	•			
Central neurocytoma		•		
Extraventricular neurocytoma		•		
Cerebellar liponeurocytoma		•		
Paraganglioma of the spinal cord	•			
Papillary glioneuronal tumour	•			
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	•			
Pineal tumours				
Pineocytoma	•			
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation		•	•	
Pineoblastoma				•
Papillary tumour of the pineal region		•	•	
Embryonal tumours				
Medulloblastoma				•
CNS primitive neuroectodermal tumour (PNET)				•
Atypical teratoid / rhabdoid tumour				•
Tumours of the cranial and paraspinal nerves				
Schwannoma	•			
Neurofibroma	•			
Perineurioma	•	•	•	
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)		•	•	•
Meningeal tumours				
Meningioma	•			
Atypical meningioma		•		
Anaplastic / malignant meningioma			•	
Haemangiopericytoma		•		
Anaplastic haemangiopericytoma			•	
Haemangioblastoma	•			
Tumours of the sellar region				
Craniopharyngioma	•			
Granular cell tumour of the neurohypophysis	•			
Pituicytoma	•			
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis	•			

Tabella 1. Grading WHO dei tumori del SNC (Louis et al., 2007).

3.1 Il glioblastoma multiforme

Il glioblastoma multiforme (GBM) è un astrocitoma di IV grado e rappresenta la forma più frequente e maligna fra i tumori cerebrali primari: costituisce da solo il 60-70% degli astrocitomi ad alto grado di malignità (Louis et al., 2007). Il GBM si può manifestare ad ogni età, con netta prevalenza nei soggetti adulti e di sesso maschile: l'età media alla diagnosi è di 64 anni, con un rapporto maschi:femmine pari a 3:2 (Fisher et al., 2007). La prognosi generalmente è infausta: la maggior parte dei pazienti muore dopo soli 12-15 mesi dalla diagnosi, anche se sottoposti a cicli di trattamento aggressivi; meno del 3% dei pazienti riesce a sopravvivere fino a cinque anni dalla diagnosi (Stupp et al., 2005; Ohgaki and Kleihues, 2005).

Il GBM si manifesta con cefalea, nausea, sonnolenza, attacchi epilettici, deficit neurologici e disfunzioni cognitive (Bondy et al., 2008), sintomi tipici di una crescente pressione endocranica, dovuta alla presenza di una massa in espansione all'interno del cranio, che causa indebolimento della barriera ematoencefalica ed edema vasogenico. La presenza della lesione neoplastica si rivela efficacemente attraverso la tomografia computerizzata e la risonanza magnetica nucleare (Behin et al., 2003).

Da un punto di vista clinico, il GBM si presenta in due forme distinte: il GBM primario è una lesione estremamente aggressiva che insorge *de novo* in età avanzata (età media 55 anni), mentre il GBM secondario si sviluppa a partire da astrocitomi con grado di malignità inferiore, in età più precoce (età media 45 anni), ed evolve progressivamente nell'arco di 5-10 anni, un tempo significativamente più lungo rispetto a quello dei GBM primari (meno di tre mesi). Nella maggioranza dei casi (più del 90%) i glioblastomi si manifestano direttamente come gliomi di IV grado, senza che in precedenza siano stati riscontrati segni clinici o istologici di una lesione di minor grado. (Furnari et al., 2007; Ohgaki and Kleihues, 2005). Il GBM primario e secondario, nonostante siano morfologicamente indistinguibili ed entrambi abbiano prognosi infausta, costituiscono entità patologiche ben distinte caratterizzate da aberrazioni molecolari differenti e diversa risposta alla radio/chemioterapia.

Il glioblastoma multiforme è un tumore estremamente eterogeneo dal punto di vista morfologico e genetico. Il sistema di classificazione WHO individua tre entità clinico-patologiche distinte di glioblastoma: gliosarcoma (2%), costituito da aree con caratteri tipici di glioma e sarcoma, GBM a cellule giganti (5%), caratterizzato dalla presenza di numerose cellule giganti pleomorfe e multinucleate, da una matrice extracellulare ricca

di collagene e linfociti infiltranti e da una crescita ben circoscritta, che garantisce una migliore prognosi, e GBM convenzionale (93%) (Louis et al., 2007; Miller and Perry, 2007; Reifenberger and Collins, 2004). Recentemente sono state descritte altre varianti, fra cui il GBM a cellule piccole e il GBM con caratteri oligodendrogliali (Miller and Perry, 2007). Istopatologicamente il glioblastoma si distingue dai gliomi di grado inferiore per la necrosi diffusa, l'estesa proliferazione vascolare, la resistenza agli stimoli apoptotici e l'elevata capacità di infiltrare il tessuto cerebrale sano. La neoangiogenesi e la necrosi tissutale sono conseguenze del rapido accrescimento della massa tumorale, che compromette la vascolatura preesistente, determinando un'ossigenazione inadeguata. La massa necrotica centrale può occupare più dell'80% della massa totale del tumore ed è circondata da una zona periferica di tessuto tumorale ipercellulare, che appare come una morbida rima grigia.

In risposta all'apporto insufficiente di ossigeno e di nutrienti, le cellule cancerose attivano fattori pro-angiogenici sensibili ad ipossia. Fra questi il principale è HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1), che induce la trascrizione di geni implicati nei processi di angiogenesi, quali quelli codificanti VEGF e il suo recettore. I microvasi di nuova formazione sono, però, aberranti e suscettibili ad eventi trombotici ed emorragici, che li rendono incapaci di soddisfare la domanda metabolica delle cellule neoplastiche, generando ulteriore anossia e morte cellulare per necrosi. Le emorragie intratumorali sono, quindi, frequenti e si manifestano come macchie di colore rosso-marrone all'interno della massa tumorale. Inoltre il tessuto cerebrale circostante mostra un edema marcato (Preusser et al., 2006).

Un'altra caratteristica fondamentale che rende il glioblastoma particolarmente aggressivo è la sua tendenza ad invadere il tessuto circostante. Le cellule di GBM infiltrano il parenchima cerebrale preferenzialmente lungo le porzioni di materia bianca e la membrana basale dei vasi sanguigni, solo raramente si estendono al di fuori del tessuto nervoso. Tale processo metastatico richiede l'interazione delle cellule neoplastiche con la matrice extra-cellulare e con le cellule adiacenti, nonché la coordinazione di eventi biochimici che promuovono la degradazione proteolitica della matrice e il movimento attivo delle cellule cancerose (Nakada et al., 2007). La natura altamente infiltrante del GBM è uno degli elementi maggiormente responsabili dello scarso successo terapeutico, poiché impedisce la rimozione completa della massa tumorale attraverso la resezione chirurgica; le cellule cancerose migranti risultano, inoltre, relativamente resistenti alla radioterapia e alla chemioterapia a causa del loro

turn-over ridotto. Per questi motivi quasi tutti i glioblastomi mostrano recidive in genere dopo 6,9 mesi dalla resezione chirurgica e dalla terapia adiuvante (Stupp et al., 2005).

Le aberrazioni genetiche alla base dei GBM sono estremamente complesse ed eterogenee. Tuttavia sono state individuate alterazioni frequenti di percorsi molecolari che sembrano rilevanti dal punto di vista patogenetico. Si tratta di aberrazioni numeriche e strutturali, delezioni, amplificazioni e perdita di eterozigosi (LOH) che portano all'attivazione inadeguata di vie di segnalazione intracellulare, coinvolte per lo più nella regolazione della proliferazione e del ciclo cellulare. Ad esempio sono state trovate aberrazioni a carico di *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) (Furnari et al., 2007; Wen et al., 2008, Sugawa et al., 1990; Frederick et al., 2000), *PDGFR* (platelet-derived growth-factor receptor) (Clarke and Dirks 2003), *PTEN* (Network, 2008; Ichimura et al., 2004), *TP53*, *MDM2*, *CDKN2A* (Ohgaki and Kleihunes, 2007), e *RB* (Ueki et al., 1996; Ichimura et al., 2004; Schmidt et al., 1994).

I *pathway* alterati nei GBM primario e secondario sono fondamentalmente gli stessi. Anche se le due tipologie di glioblastoma sono caratterizzate da differenti e specifiche aberrazioni, spesso si sono osservate anomalie uguali, ma con frequenza diversa. In particolare, l'amplificazione di *EGFR* e la perdita di *PTEN* si riscontrano con una frequenza relativamente alta nei glioblastomi *de novo*, mentre mutazioni a carico di *TP53* sono tipiche dei glioblastomi secondari. La perdita del 10q (LOH 10q) è stata osservata con la stessa frequenza (60-80%) in entrambi i sottotipi e generalmente coesiste con una qualsiasi delle mutazioni sopra menzionate, le quali invece sono mutuamente esclusive. Questo suggerisce la possibilità che la perdita di eterozigosità a livello del 10q giochi un ruolo centrale nello sviluppo dei GBM sia primari che secondari (Ohgaki and Kleihunes, 2005).

3.2 Alterazioni epigenetiche nel glioblastoma multiforme

I glioblastomi primari mostrano, con una frequenza pari all'80%, una globale ipometilazione, che può interessare sia sequenze ripetute che singoli loci genici (Cadieux et al., 2006). Una conseguenza dell'ipometilazione delle sequenze ripetute è la predisposizione ad eventi di rottura dei cromosomi ed alterazioni nel numero di copie di alcune regioni genomiche. L'ipometilazione sito-specifica interessa, ed esempio, *MAGEA1*, un gene della linea germinale maschile che, diventando trascrizionalmente

attivo, causa l'inibizione delle funzioni di p53 e la resistenza alla chemioterapia (Liu et al., 2004).

L'ipermetilazione è locus specifica e interessa prevalentemente le isole CpG situate nei promotori di geni oncosoppressori coinvolti nella regolazione di processi come la progressione del ciclo cellulare, la riparazione del DNA, l'apoptosi, l'angiogenesi, l'invasione del tessuto sano e la resistenza ai farmaci. Tra i geni ipermetilati nei gliomi a livello dei promotori vi sono quelli codificanti per componenti dei *pathways* di Rb, PI3K e p53 (*CDKN2A* e *PTEN*) (Costello et al., 1996; Baeza et al., 2003; Nakamura et al., 2001; Amatja et al., 2005), *EMP3* (epithelial membrane protein 3), un gene coinvolto nell'inibizione della proliferazione cellulare e nell'interazione cellula-cellula (Alaminos et al., 2005), *PCDH gamma A11* (protocadherin-gamma sub family A11), un gene coinvolto nell'inibizione della migrazione tumorale nel parenchima cerebrale, che risulta ipermetilato nell'87% dei GBMs, nell'88% degli astrocitomi e nel 100% delle linee cellulari di glioma (Waha et al., 2005), *MGMT*, che codifica per una proteina coinvolta nella riparazione del DNA, la cui espressione protegge le cellule normali dai cancerogeni e le cellule tumorali dall'alchilazione da parte di agenti chemioterapici (Esteller et al., 1999), *SOCS1*, la cui espressione induce l'aumento della sensibilità alle radiazioni ionizzanti e la diminuzione dell'attività delle MAP chinasi associate al *pathway* di ERK (Zhou et al., 2007).

Per quanto riguarda le alterazioni epigenetiche presenti nelle staminali tumorali di glioblastoma, si ha il blocco del *pathway* di differenziamento astrogliale; questo evento è causato dal silenziamento del gene *BMPR1B* (BMP receptor 1B) a causa dell'azione di EZH2 e della metilazione del DNA. L'espressione di questo recettore può essere ripristinata dalla somministrazione di agenti demetilanti, ottenendo così la riattivazione del differenziamento astrogliale e una diminuzione della tumorigenicità (Lee et al., 2008). Il gene che codifica per CD133, una proteina transmembrana utilizzata come marcatore per identificare le cellule staminali tumorali di GBM, è soggetto a regolazione epigenetica: in alcune linee cellulari di GBM le isole CpG del suo promotore sono metilate impedendo la trascrizione, mentre in altre sono ipometilate (Tabu et al., 2008).

Differenti sottotipi di glioma con diverso *grading* mostrano distinti profili aberranti di metilazione del DNA. Ad esempio, i glioblastomi secondari hanno un'alta frequenza media di metilazione nei promotori rispetto ai GBM primari, in particolare per i promotori dei geni *CDKN2A*, *RB1*, *MGMT* e *TIMP3*. I gliomi a basso grado ed i GBM

secondari mostrano una metilazione del promotore di *PTEN* con conseguente attivazione del *pathway* di AKT, mentre questo evento è raro nei glioblastomi primari (Ohgaki et al., 2007).

Nel GBM, anche molteplici miRNAs mostrano un'espressione aberrante o repressa. Il miR128, la cui espressione risulta ridotta nel GBM, regola l'espressione della proteina BMI1 appartenente al Polycomb complex, provocando un aumento dei livelli di H3K27me3 (Godlewsky et al., 2008). Il miR-124 ed il miR-137, in grado di inibire la proliferazione nel GBM e indurre il differenziamento in cellule staminali neurali e in cellule staminali tumorali cerebrali, hanno un'espressione ridotta nei GBM primari e negli astrocitomi anaplastici. L'espressione del miR-137 può essere recuperata in seguito al trattamento con 5-aza-2'-deossicitidina, suggerendo che la sua regolazione è soggetta alla metilazione del DNA (Silber et al., 2008).

Anche l'espressione di alcune HDACs è alterata nel GBM: le HDACs di classe II e IV sono parzialmente represses, causando un netto aumento nell'acetilazione dell'istone 3, mentre le HDACs di classe III, in particolare SIRT1, mostrano bassi livelli di espressione.

Inoltre un sequenziamento su larga scala del genoma di molti GBM ha rivelato l'esistenza di numerose mutazioni in molti geni coinvolti nella regolazione epigenetica tra cui quelli codificanti per le istone deacetilasi HDAC2 e 9, le istone demetilasi JMJD1A e 1B, le istonemetiltransferasi SET7, SETD7, MLL, MLL4 e la methyl-CpG binding protein1 (Parsons et al., 2008).

4. Le cellule staminali tumorali

4.1 La teoria delle *Cancer Stem Cells*

Nel corso degli anni sono stati proposti diversi modelli per chiarire l'origine delle neoplasie e studiare il tipo di cellula in grado di accumulare mutazioni aberranti che conferiscono un potenziale proliferativo incontrollato. Il modello stocastico tradizionale prevede che tutte le cellule cancerose abbiano lo stesso potenziale tumorigenico e partecipino alla progressione neoplastica in egual misura.

Recentemente è stato proposto un secondo modello sull'origine delle neoplasie, definito "gerarchico", secondo il quale le cellule del tessuto tumorale sono organizzate rispettando una precisa gerarchia e solo una piccola sottopopolazione di cellule, definite staminali tumorali (*cancer stem cells*, CSCs o *tumor initiating cells*, TICs), è in grado di iniziare e propagare il tumore. Una delle caratteristiche principali delle CSCs è, infatti, la tumorigenicità, ovvero la capacità di originare nuovamente il tumore se impiantate in un ospite immunocopromesso. Le altre cellule tumorali, che derivano dal differenziamento parziale o terminale di quelle staminali, sebbene costituiscano la maggior parte della massa tumorale, non sostengono la carcinogenesi e possono essere eliminate dal trattamento chemioterapico (Reya et al., 2001; Pardal et al., 2003). Le CSCs condividono una serie di aspetti funzionali con le normali cellule staminali: entrambe le tipologie possiedono un potenziale proliferativo illimitato e la capacità di originare sia cellule identiche a sé stesse (divisione simmetrica) che una progenie con diversi gradi di differenziamento (divisione asimmetrica). Sulla base di queste analogie è stato ipotizzato che le CSCs derivino da cellule staminali normali che iperproliferano in seguito a trasformazione neoplastica. Le cellule staminali tissutali, essendo fortemente esposte agli stress genotossici, a causa della loro lunga vita, rappresentano probabilmente il *target* preferenziale degli eventi mutazionali, i quali richiedono diversi anni per accumularsi e scatenare il tumore. Tuttavia, da alcuni studi emerge che le CSCs potrebbero anche formarsi da cellule progenitrici o *committed* che, per effetto di mutazioni, de-differenziano e acquisiscono caratteristiche di staminalità (Lobo et al., 2007). E' ragionevole pensare che nelle CSCs i meccanismi molecolari coinvolti nel *self-renewal*, fondamentali per le normali cellule staminali, siano alterati, potenziando l'attività proliferativa della cellula e mantenendola in uno stato indifferenziato permanente. L'esistenza delle cellule staminali tumorali è stata provata per la prima volta nel contesto di uno studio sulla leucemia mieloide acuta, che ha mostrato come soltanto le cellule tumorali fenotipicamente simili a quelle staminali ematopoietiche (CD34+ CD38-) erano in grado di riprodurre il tumore in topi NOD/SCID (Lapidot et al., 1994; Bonnet and Dick, 1997). Sfruttando l'espressione di noti marcatori caratteristici e valutando la capacità clonogenica *in vitro* e quella tumorigenica *in vivo* della popolazione cellulare candidata, sono state isolate cellule staminali tumorali da diversi tumori solidi, quali il carcinoma della mammella (Al-Hajj et al., 2003), i principali tumori cerebrali (Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2003), il melanoma (Fang et al., 2005), il tumore della prostata (Collins et al., 2005), il cancro del colon-retto

(Dalerba et al., 2007; O'Brien et al., 2007; Ricci et al., 2007) e il tumore del pancreas (Li et al., 2007).

4.2 Cellule staminali tumorali cerebrali

Negli ultimi anni è stata documentata la presenza di cellule staminali tumorali, definite *Brain Tumor Stem Cells* (BTSCs) o *Glioma Stem Cells* (GSCs), all'interno di tumori cerebrali. La loro origine rimane, tuttora, controversa: secondo una prima ipotesi, la trasformazione neoplastica si verifica in una cellula staminale neurale, che acquisisce un fenotipo maligno, diventando tumorigenica. In alternativa, l'accumulo di mutazioni può avere luogo in una cellula *committed* (progenitore gliale), determinandone il de-differenziamento, o ancora in una cellula gliale/neuronale matura (terminalmente differenziata), che assume, quindi, un fenotipo neoplastico [Fig.6].

Le BTSCs presentano due caratteristiche fondamentali: tumorigenicità e *self renewal*. Tali cellule sono in grado di iniziare e propagare il tumore in seguito a impianti seriali ortotopici in topi immunocompromessi, mantenendo le caratteristiche della neoplasia primaria (Singh et al., 2004; Vescovi et al., 2006), e, come le normali cellule staminali neurali, generano, in terreno privo di siero, ma addizionato di EGF (epidermal growth factor) e bFGF (basic fibroblast growth factor), aggregati sferici clonali in sospensione dotati di autorinnovamento e multipotenzialità, chiamati neurosfere. In seguito a disgregazione di tali sfere, le cellule staminali tumorali cerebrali, in presenza delle condizioni di coltura sopra descritte, sono in grado di ricostituire neurosfere secondarie. Questo processo, chiamato *neurosphere assay*, replicato per un numero di passaggi di coltura illimitato, evidenzia l'elevata capacità rigenerativa delle BTSCs (Ignatova et al., 2002; Singh et al., 2003; Vescovi et al., 2006) [Fig.7]. Le BTSCs sono dotate, però, di una maggiore capacità di autorinnovamento rispetto alle cellule staminali neurali: le neurosfere derivate dal tumore possono essere coltivate *in vitro* per diversi mesi senza modificare il loro potenziale proliferativo, mentre le normali cellule staminali neurali umane possono essere mantenute in coltura al massimo per un mese (Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2003). Non sorprende, quindi, il fatto che nelle BTSCs siano state ritrovate alterazioni a carico dei *pathway* coinvolti nel controllo del *self-renewal*: Shh, Notch e Wnt.

post-natale tale via di trasduzione del segnale rimane attiva e regola la proliferazione delle cellule staminali adulte, permettendo il mantenimento o la riparazione dei tessuti. La famiglia di ligandi Hedgehog è costituita da tre proteine: Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) e Indian Hedgehog (Ihh). Shh è una glicoproteina abbondantemente espressa durante lo sviluppo cerebellare da parte delle cellule del Purkinje, è uno dei principali mitogeni delle cellule progenitrici dei granuli cerebellari esterni ed è il migliore esempio di molecola morfogenica (Briscoe, 2009; Wechsler-Reya et al., 1999). Una volta secreta, Shh lega Patched (Ptch), un recettore a dodici domini transmembrana, espresso principalmente nei precursori dell'*external germinal layer* (EGL). Ptch inibisce Smoothened (Smoh), un recettore a sette domini trans-membrana, dotato di intrinseca attività catalitica e di segnalazione (Chen et al., 2004). In assenza dell'attività di Smoh, i fattori di trascrizione Gli, effettori del *pathway* Shh, sono trattenuti a livello dei microtubuli da un complesso multiproteico che include le proteine Fused e Suppressor of Fused (Sufu) (Murone et al., 2000). In tale situazione Gli1 non può svolgere la sua funzione di attivatore della trascrizione, mentre altri due membri della famiglia, Gli2 e Gli3, attivati attraverso un taglio proteolitico, fungono da repressori trascrizionali (Ruiz et al., 2002; Ruiz, 1999; Ingham et al., 2001). Il legame di Shh a Patched attiva Smoh che, inibendo il complesso costituito da Fused e Sufu, consente il rilascio e la traslocazione nel nucleo di Gli1. Tra i geni *target* di Gli1 si ricordano: GLI1 stesso, i geni codificanti i fattori WNT, PTCH, N-MYC, C-MYC e ciclinaD1. L'attivazione di Smoh, inoltre, inibisce il taglio proteolitico di Gli2 e Gli3 (Ruiz et al., 2002). E' stato osservato che l'attivazione aberrante del *pathway* di Hedgehog in BTSCs è correlata a prognosi negativa dei pazienti (Xu et al., 2008).

- Notch

Il pathway di Notch è fondamentale per l'organogenesi e il corretto sviluppo e funzionamento del sistema nervoso centrale. La famiglia Notch è costituita da quattro proteine transmembrana (Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4) aventi la funzione di recettori. I ligandi di Notch sono, anch'essi, proteine transmembrana come Jagged o Delta-Like Ligands (DLL). L'attivazione del recettore, in seguito al contatto tra cellule adiacenti, induce due tagli proteolitici di Notch, S2 e S3. Il taglio S2 viene effettuato da metalloproteasi TACE (Brou et al., 2000), che, rimuovendo la porzione extracellulare, rendono il recettore suscettibile all'azione delle γ -secretasi, responsabili del taglio

proteolitico S3 a livello del dominio transmembrana (De Strooper et al., 1999). Il taglio S3 libera la porzione intracellulare di Notch (Notchintra o NotchIC), che trasloca nel nucleo e, interagendo con fattori trascrizionali (CSL), consente la trascrizione di geni *target*. Le BTSCs sono caratterizzate da un'attivazione aberrante di Notch, che favorisce il self renewal e inibisce il differenziamento cellulare. Questo è dimostrato dall'aumentata espressione del marker di staminalità Nestina (Shih and Holland, 2006) e dei trasportatori ABC (Bhattacharya et al., 2007) e dalla formazione di neurosfere in terreno privo di siero (Wang et al., 2010).

- Wnt

Il sistema molecolare Wnt (*Wingless Type*) controlla lo sviluppo embrionale di molti organi e tessuti tra cui il SNC (Miller, 2001) regolando il differenziamento, la polarità, la migrazione e il destino cellulare. Nell'adulto, questo sistema provvede al mantenimento dell'omeostasi tissutale nell'epitelio intestinale, nella pelle e nel tessuto emopoietico (Cadigan et al., 2006). Mutazioni a carico del sistema Wnt, non solo compromettono seriamente lo sviluppo embrionale, ma sono implicate anche nella patogenesi di diversi tipi di cancro (Logan et al., 2004).

Nell'uomo la famiglia di Wnt è costituita da almeno 19 glicoproteine cys-rich (23-24 residui di cisteina conservate) secrete nell'ambiente extracellulare e con azione a corto raggio, caratterizzate dalla presenza di un dominio lipidico post-traduzionale (palmitoilazione). Le proteine Wnt agiscono legandosi ai recettori della famiglia Frizzled (Fzd), la cui espressione, durante lo sviluppo, è finemente regolata spazialmente e temporalmente (Nusse et al., 2001). Le molteplici combinazioni date dal legame di differenti Wnt con differenti recettori Fzd attivano tre diverse vie di segnalazione intracellulare: il *pathway* canonico β -catenina dipendente e 2 *pathway* non canonici β -catenina indipendenti (Wnt/ Ca^{2+} e *Planar Cell Polarity*) (Cadigan et al., 2006) [Fig.8]. In alcuni studi è stato osservato che ligandi, come Wnt1, Wnt3a e Wnt8 attivano preferenzialmente la via canonica, mentre altri, come Wnt5a e Wnt11 quelle non canoniche (Du et al., 1995; Shimizu et al., 1997; Kuhl et al., 2000).

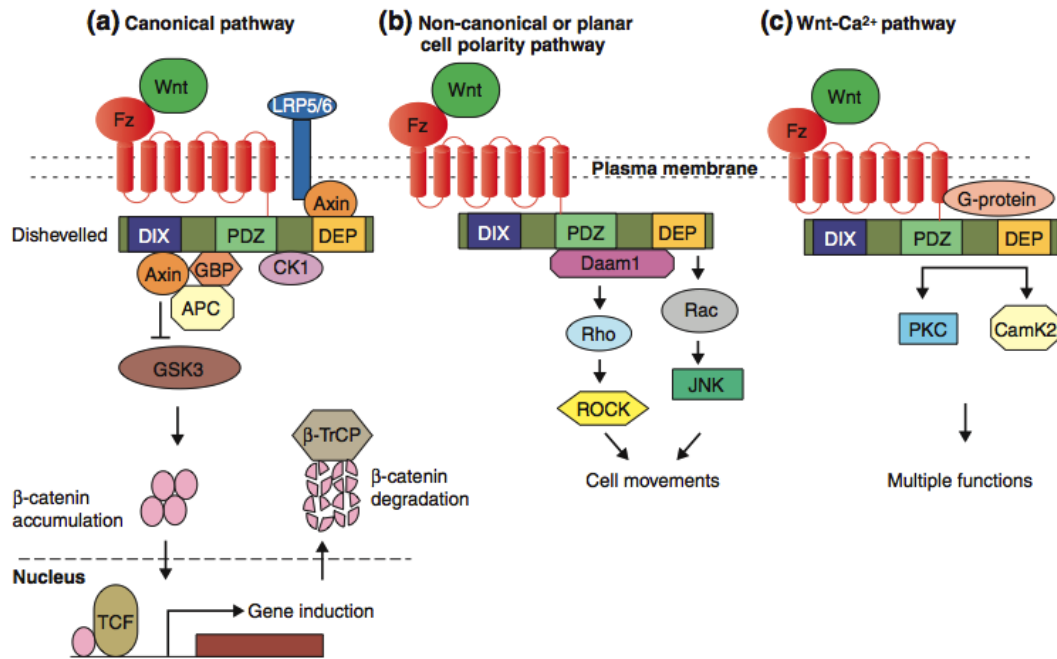


Figura 8. Rappresentazione schematica delle tre vie di segnalazione intracellulare di Wnt. **A.** Pathway canonico. **B.** Planar cell polarity pathway. **C.** Pathway Wnt/Ca²⁺ (Habas et al., 2005)

Il *pathway* più studiato è quello β-catenina dipendente. La β-catenina esiste in tre pool a localizzazione e funzione diverse (Nelson et al., 2004):

- β-catenina legata all'E-caderina a livello della membrana plasmatica, coinvolta nella formazione delle giunzioni aderenti delle cellule epiteliali;
- β-catenina nucleare complessata a fattori di trascrizione della famiglia TCF (*T-Cell Factor*) /LEF (*Lymphoid Enhancing Factor*) che promuove la trascrizione di geni bersaglio;
- β-catenina legata al “complesso di distruzione” APC/Axina/GSK-3β, che ne promuove la degradazione.

In assenza di ligandi Wnt, β-catenina è degradata rapidamente dal complesso multiproteico APC/Axina/GSK-3β (Glycogen Synthase Kinase-3β). In tale complesso APC e Axina facilitano la fosforilazione di β-catenina da parte di GSK-3β e ne sono esse stesse substrato, venendo fosforilate e aumentando così la quantità di β-catenina legata. Una volta fosforilata, β-catenina viene legata dalla proteina F-box β-TrCP (β-transducin repeat containing protein), una componente del complesso E3 ubiquitina ligasi, che la rende poliubiquitinata e quindi degradabile dal proteasoma (Nelson et al., 2004).

In presenza delle proteine Wnt, i recettori Fzd e i corecettori LRP (*low density lipoprotein receptor related protein*) 5 o 6 vengono attivati e causano la fosforilazione di Dishevelled (Dvl), proteina dello *scaffold* citoplasmatico, che inattiva GSK-3 β e la Casein chinasi 1 α (CK1 α). L'inibizione del “complesso di distruzione” determina un aumento di β -catenina citoplasmatica non fosforilata che, migrando nel nucleo e complessandosi ai fattori di trascrizione TCF/LEF funge da trans-attivatore trascrizionale dei suoi geni *target* (Miller, 2001). Alcuni geni bersaglio sono importanti per la progressione del ciclo cellulare, ad esempio *c-Myc*, *CCND1* (ciclina D1) e *GAS* (gastrina), altri sono, invece, inibitori dell'apoptosi, come *BIRC5* (survivina), altri ancora sono geni in grado di promuovere la progressione tumorale, come *MMP7* (matrix metalloproteinase-7), coinvolto nella degradazione della membrana basale e della matrice extracellulare (Stadeli et al., 2006). E' stato osservato che *Nanog* e *OCT-4*, due dei quattro fattori di trascrizione necessari per il mantenimento del *self-renewal* e della pluripotenza nelle cellule staminali embrionali, sono geni *target* di Tcf3, dimostrando l'importanza del *pathway* di Wnt nel mantenimento della staminalità. L'espressione di tali fattori è presente anche nelle BTSCs (Cole et al., 2008; Pereira et al., 2006). Quando il sistema Wnt non è stimolato, i fattori di trascrizione TCF/LEF rimangono associati con i corepressori trascrizionali Gro (*Groucho*) e CtBP (*C-Terminal Binding Protein*) che interagiscono con le istone-deacetilasi (HDAC), formando un complesso inattivo (Stadeli et al., 2006; Yamaguchi et al., 2001).

Il *pathway* di Wnt canonico può essere inibito da antagonisti extracellulari, come *secreted FZD related protein* (sFRP) e *Wnt inhibitory factor 1* (WIF1), che agiscono come *decoy receptors* solubili, o da membri delle famiglie SOST (Sclerosteosis) e Dickkopf (Dkk), che compromettono l'attività del corecettore LRP5/6 (Moon et Brown 2002). L'attivazione aberrante del *pathway* canonico Wnt/ β -catenina, il cui ruolo è ben noto nell'insorgenza di neoplasie emopoietiche, è implicata nella regolazione della proliferazione e del potenziale tumorigenico delle BTSCs (Reguart et al., 2005) e, quindi, nell'insorgenza e nella progressione di gliomi maligni. β -catenina è stata indicata come *marker* prognostico in GBM, poiché i livelli proteici e di mRNA, aumentati in astrocitomi di alto grado, sembrano correlare con la malignità della neoplasia (Sareddy et al., 2009; Liu et al., 2011; Liu et al., 2010). Tuttavia, contrariamente a quanto osservato in altri tumori, nei gliomi non sono state ritrovate mutazioni a carico dell'esone 3 della β -catenina, bersaglio della fosforilazione di GSK-

3 β (Polakis et al., 1999; Gotze et al., 2010), o di APC (ad eccezione dei campioni ottenuti da pazienti affetti dalla Sindrome di Turcot) (Sarin et al., 2008). Mutazioni a carico di APC, frequenti nella poliposi adenomatosa familiare del colon e nei tumori colon-rettali (Morin et al., 1997; Giles et al., 2003; Polakis, 2007) causano, in seguito all'accumulo di β -catenina nel citoplasma e nel nucleo, un'attivazione anomala della trascrizione dei geni *target* del complesso β -catenina/TCF (Kikuchi, 2003, Tissier et al., 2005). L'assenza di mutazioni a carico dei principali componenti del sistema Wnt/ β -catenina suggerisce l'ipotesi che l'*over*-espressione di β -catenina e l'attivazione aberrante di tale *pathway* sia dovuta ad uno sbilanciamento dell'espressione dei ligandi e degli antagonisti durante l'iniziazione e la progressione tumorale. Infatti, negli astrocitomi di alto grado, e più precisamente nel GBM, risulta aumentata l'espressione di regolatori positivi del *pathway* di Wnt (Dvl3, FRAT1, Pygo2, Tcf4 e Lef11) e diminuita quella di antagonisti e inibitori. Ad esempio è stata osservata l'ipermetilazione dei promotori di WIF1, sFRP (soprattutto GBM de novo), Dkk (soprattutto GBM secondario) (Gotze et al., 2010; Yang et al., 2010), fattore che induce il silenziamento di tali geni.

Alcuni ligandi Wnt attivano vie di trasduzione del segnale β -catenina indipendenti, coinvolti, soprattutto, nel controllo della motilità cellulare. La via Planar Cell Polarity (PCP) definisce le polarità asimmetriche della cellula, coordina i cambiamenti della forma cellulare e i movimenti cellulari (Akiyama, 2000; Giles et al., 2003; Takahashi-Yanaga et al., 2007). Il recettore Fzd, legato a Wnt, ma non associato ai corecettori LRP attiva, mediante Dishevelled, Rho e Rac che, a loro volta, attivano proteine che controllano il rimodellamento del citoscheletro tra cui JNK, ROCK e Daam (Habas et al., 2003; Habas et al., 2001). Dato il ruolo centrale della via PCP nella regolazione dell'adesione cellulare e della motilità, non sorprende il fatto che tale via di segnalazione intracellulare, deregolata in molte neoplasie, sia coinvolta nell'invasione del parenchima da parte delle cellule tumorali e nella formazione di metastasi (Christofori et al., 2006; Yamaguchi et al., 2005). Wnt5a, *up*-regolato in melanoma, tumore del polmone, tumore del seno e cancro prostatico, promuove la formazione di metastasi attivando Rac e JNK (Weeraratna et al., 2002; Kurayoshi et al., 2006; Pukrop et al., 2006). Il GBM è caratterizzato da un'elevata espressione di Wnt5a, attivatore dei *pathway* non canonici di Wnt, in grado di indurre la migrazione cellulare attraverso modificazioni del citoscheletro cellulare e l'*up*-regolazione di metalloproteasi, come

MMP2 (Kamino et al., 2011). Ciò potrebbe spiegare la capacità del glioblastoma di infiltrare in modo aggressivo il tessuto circostante. E' stato dimostrato, inoltre che i recettori Fzd7 e Fzd10, che attivano il *pathway* PCP, sono *over-espressi* e facilitano la formazione di metastasi e la migrazione di cellule di epatocarcinoma, tumore del colon e sarcoma sinoviale (Merle et al., 2004; Vincan et al., 2007; Ueno et al., 2008; Fukukawa et al., 2009).

Nel *pathway* Wnt/ Ca^{2+} , il legame di Wnt al recettore Fzd attiva, mediante proteine G, la fosfolipasi C che causa l'aumento del livello di calcio intracellulare e l'attivazione di effettori a valle, come la proteina chinasi C (PKC) (Miller, 2001; Kuhl et al., 2000). Questo *pathway* è coinvolto nella progressione tumorale. Ad esempio Wnt5a causa la formazione di metastasi in melonoma attraverso l'induzione della transizione epitelio mesenchimale, dovuta all'attivazione della via di segnalazione intracellulare PKC/ Ca^{2+} (Dissanayake et al., 2007).

Per quanto riguarda l'espressione di marcatori cellulari, in terreno di coltura privo di siero e addizionato di EGF e bFGF, le BTSCs esprimono markers tipici delle cellule staminali neurali normali, come CD133 e Nestina (Galli et al., 2004; Sanai et al., 2005; Singh et al., 2004); l'eliminazione dei mitogeni e l'aggiunta di siero al medium possono indurre il differenziamento delle BTSCs in tutti i *lineages* neurali e l'espressione di marcatori di differenziamento, come il marcatore neuronale MAP2 (Microtubule Associated Protein 2), il marcatore astrocitico GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) e il marcatore oligodendrocitico GC (Galactocerebroside) (Fan et al., 2007; Galli et al., 2004; Hemmati et al., 2003; Suslov et al., 2002).

Le BTSCs sono state individuate per la prima volta nel 2002 dal gruppo di Ignatova attraverso la selezione di cellule esprimenti il *marker* delle cellule staminali neurali normali CD133 da un campione di GBM umano. In alcuni studi sono state osservate aberrazioni genetiche e cromosomiche in cellule CD133+ isolate da campioni di tumori cerebrali; ciò ha dimostrato l'origine effettivamente neoplastiche delle stesse escludendo l'ipotesi che potessero essere cellule staminali neurali asportate con il tumore. Tale sottopopolazione rappresenta solo una piccola frazione delle cellule cancerose (0,3 - 25,1 %), mentre le rimanenti sono cellule differenziate con un potenziale proliferativo limitato (Singh et al., 2003). Tuttavia, questa minoranza assume un ruolo centrale nello sviluppo tumorale: in seguito ad immunopurificazione e inoculo in modelli animali, soltanto le cellule CD133+ sono risultate tumorigeniche,

riproducendo una lesione neoplastica con le stesse caratteristiche istologiche/citologiche del tumore d'origine e mantenendo questo fenotipo anche dopo trapianti seriali. Viceversa cellule CD133-, isolate dallo stesso paziente, hanno fallito nella formazione del tumore sebbene impiantate in numero mille volte maggiore (Singh et al., 2003; Singh et al., 2004; Galli et al., 2004).

Non essendo nota la funzione molecolare di CD133, l'effettivo collegamento tra la sua espressione e la staminalità tumorale non è ancora chiaro. Studi più recenti hanno dimostrato che anche cellule CD133- di neoplasie cerebrali possono generare tumori (Zheng et al., 2007; Wang et al., 2008). In uno studio di Chen e colleghi del 2010, sono state individuate tre popolazioni cellulari con caratteristiche staminali in grado di generare tumori con diverse velocità di crescita *in vitro* e *in vivo*. La prima popolazione è costituita da cellule CD133- e può originare sia cellule CD133+ che CD133-; la seconda popolazione è CD133+ e anch'essa dà origine ad una progenie mista; la terza popolazione è rappresentata da cellule CD133- non in grado di dare luogo a cellule CD133+. Le prime due popolazioni cellulari possedevano un velocità di crescita comparabile tra loro, mentre le cellule della terza popolazione crescevano più lentamente.

Molte delle caratteristiche maligne peculiari del glioblastoma possono essere attribuite proprio alla sua componente staminale tumorale; per questo, l'identificazione di specifici *pathways* coinvolti nel mantenimento e nella funzione delle BTSCs potrebbero rappresentare il *target* ideale di nuove strategie terapeutiche mirate alla completa eradicazione del glioblastoma, riducendo al minimo il rischio di recidive.

5. Approcci terapeutici

Il carattere altamente aggressivo ed infiltrante del glioblastoma rende questo tumore resistente alle forme comuni di terapia antineoplastiche: la recidiva avviene nell'80% dei casi e le prospettive di vita restano comunque limitate. I gliomi maligni sono ancora considerati incurabili: la cura sintomatica, che ha lo scopo di attenuare i disturbi neurologici e di prolungare il tempo di sopravvivenza nei pazienti, prevede l'uso di corticosteroidi per ridurre l'edema peritumorale, di anticonvulsivanti per controllare gli attacchi epilettici e di anticoagulanti per ridurre il rischio di trombosi (Gilbert and

Loghin, 2005). Il trattamento standard per il glioblastoma è rappresentato dalla resezione chirurgica, seguita da radioterapia e chemioterapia. Nel 90% dei casi, purtroppo, le cellule disposte perifericamente rispetto alla lesione neoplastica rimossa danno rapidamente origine ad una nuova formazione tumorale, che si sviluppa in stretta prossimità dei margini della resezione stessa (o della sua cavità) (Lefranc et al., 2005). Il beneficio della chemioterapia rimane modesto, a causa degli effetti collaterali dei farmaci e della resistenza intrinseca del tumore. La barriera emato-encefalica (BEE), infatti, è indebolita a livello della lesione, ma rimane pressoché intatta nella regione sana adiacente, dove possono alloggiare cellule neoplastiche infiltranti. I farmaci con scarsa capacità di attraversamento della BEE non riescono a raggiungere la concentrazione terapeutica in tutte le aree interessate dalla neoplasia. Inoltre i pazienti con GBM spesso ricevono farmaci antiepilettici che, inducendo gli enzimi epatici del citocromo P450, interferiscono profondamente con la farmacocinetica degli agenti antineoplastici metabolizzati dallo stesso sistema. Per diverso tempo i trattamenti chemioterapici del GBM si sono basati sull'uso di composti ad azione alchilante come le nitrosuree. Più recentemente sono stati ottenuti risultati promettenti in seguito all'utilizzo della Temozolomide (TMZ), un agente alchilante di seconda generazione a somministrazione orale (Groves et al., 2007), capace di attraversare efficacemente la BEE. Parte della sua attività citotossica, nelle cellule di glioblastoma, viene esercitata attraverso un meccanismo pro-autofagico: la formazione di O⁶-metilguanina e il suo conseguente *mismatch* con la timina, in corso di replicazione del DNA, conducono la cellula all'arresto in fase G2/M del ciclo cellulare e alla sua morte per autofagia (Kanzawa et al., 2004). Le cellule tumorali, pertanto, possono essere indotte a morire attraverso meccanismi non apoptotici, che rappresentano una valida alternativa ai fini della distruzione di cellule gliomatose resistenti a questo tipo di morte cellulare programmata (Lefranc et al., 2007; Roos et al., 2007). Il dibattito, a tale riguardo, è ancora aperto e alcuni autori hanno evidenziato come l'attività citotossica della stessa Temozolomide sia, in realtà, riconducibile all'induzione di un'apoptosi "tardiva" e non ad un processo autofagico (Roos et al., 2007). Pare, inoltre, che apoptosi ed autofagia siano innescate a monte dagli stessi segnali e che questo possa indurre la cellula ad intraprendere entrambi i *pathways* parallelamente o a innescarne soltanto uno in maniera mutuamente esclusiva (Maiuri et al., 2007).

La somministrazione concomitante di TMZ e radioterapia, seguita poi dal trattamento adiuvante con il solo farmaco, è stata associata ad un miglioramento in termini di

sopravvivenza e ha dimostrato un basso profilo di tossicità. Questo regime di trattamento, approvato sia dalla *Food and Drug Administration* (FDA) che dalla *European Medicine Agency* (EMA), è adottato come standard per la cura dei glioblastomi di nuova diagnosi e costituisce il punto di partenza per la ricerca di combinazioni terapeutiche più efficaci. Per migliorare ulteriormente i risultati clinici, insieme ai farmaci alchilanti è possibile somministrare degli inibitori specifici degli enzimi MGMT (O^6 -metilguanina-DNA-metiltransferasi), i quali conferiscono chemioresistenza grazie alla loro capacità di riparare i danni del DNA. Recenti studi hanno, infatti, dimostrato che quando il gene codificante per MGMT è silenziato, attraverso metilazione del promotore, la chemioterapia ha un'azione determinante nella sopravvivenza dei pazienti (Soffietti et al., 2007).

Un numero crescente di farmaci, in grado di inibire selettivamente specifici *pathways* attivati in modo aberrante in GBM, sono stati testati in diversi trials clinici. Ad esempio sono stati studiati gli effetti degli anticorpi monoclonali Gefitinib e Erlotinib, inibitori selettivi di EGFR, di Imatinib, inibitore di PDGFR, conosciuto soprattutto per il trattamento della leucemia mieloide cronica, e di Bevacizumab, inibitore di VEGF (vascular endothelial growth factor), principale fattore proangiogenetico in grado di aumentare la permeabilità vascolare, la proliferazione endoteliale e di stimolare la migrazione cellulare (Hicklin and Ellis, 2005). Ad oggi solo una piccola percentuale di pazienti ha mostrato benefici derivanti da tali trattamenti (Mellinghoff et al., 2005; Wen et al., 2006). Solo gli studi relativi alla combinazione di Bevacizumab e Irinotecan hanno mostrato un aumento della sopravvivenza dei pazienti affetti da gliomi di grado IV (Vredenburgh et al., 2007a; Vredenburgh et al., 2007b).

La resistenza dei glioblastomi alle comuni terapie antineoplastiche, utilizzate per colpire cellule ad elevato grado di proliferazione e non tumorigeniche, è dovuta soprattutto alla presenza della sottopopolazione di BTSCs quiescenti. Poiché tali cellule sono responsabili dell'insorgenza neoplastica, è plausibile ipotizzare che le stesse possano sfuggire al trattamento e dare origine a recidive [Fig.9]. Effettivamente studi *in vitro* e *in vivo*, hanno evidenziato che le cellule staminali tumorali cerebrali sopravvivono ad alte dosi di radiazioni ionizzanti, grazie all'attivazione preferenziale di meccanismi di riparazione del DNA, all'aumentata regolazione delle proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare (Bao et al., 2006; Chalmers, 2007) e all'iper-espressione di geni anti-apoptotici (come *BCL-2* e *BIRC5*). La farmaco-resistenza è inoltre legata all'espressione

dei trasportatori ABC (ATP-binding cassette), una famiglia di proteine di membrana che regolano l'efflusso di sostanze tossiche (Liu et al., 2006).

La completa eradicazione delle CSCs risulta, quindi, essenziale ai fini di una remissione a lungo termine dopo il trattamento.

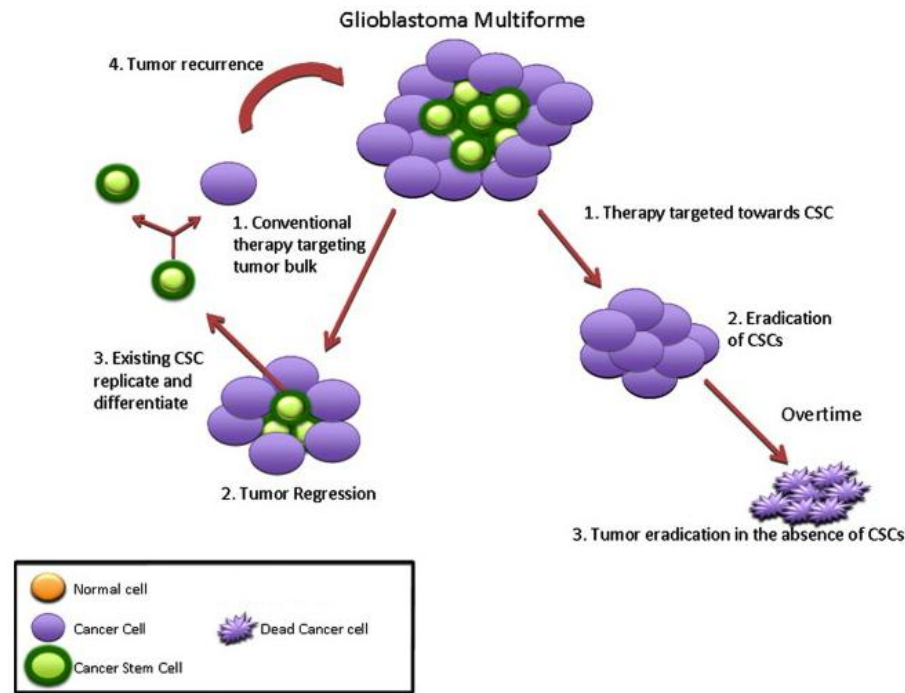


Figura 9. Le CSCs determinano la recidiva dopo l'apparente successo della terapia convenzionale. Per questo ad oggi sono oggetto di studio terapie in grado di eradicare le CSCs. (Dey et al., 2010)

La deplezione della componente staminale del tumore può essere ottenuta bloccando il *signaling* del *self-renewal*, utilizzando, ad esempio, anticorpi diretti contro Wnt (He et al., 2005), inibitori della γ -secretasi, mirati ad antagonizzare il *pathway* di Notch (Fan et al., 2006), e *small molecule inhibitors*, specifici per il recettore o il co-recettore di Hedgehog (Romer et al., 2004). Un ulteriore approccio terapeutico comprende l'utilizzo di farmaci che agiscono a livello epigenetico in grado di modificare l'espressione genica inducendo, ad esempio, il differenziamento delle BTSCs (Cinatl et al., 1996). Attualmente, quindi, le strategie terapeutiche sono finalizzate a inibire i *pathway* molecolari coinvolti nella resistenza all'apoptosi, indurre l'autofagia nelle cellule di glioblastoma, ridurre la capacità migratoria delle cellule tumorali e depletare la componente staminale della massa tumorale. La combinazione di più agenti citotossici e citostatici specifici per un preciso *target* potrebbe rivelarsi in futuro un trattamento efficace nella cura di tumori cerebrali invasivi come il glioblastoma.

Scopo

Il glioblastoma multiforme è una neoplasia mortale nella quasi totalità dei casi. Nonostante gli sforzi compiuti in ambito sperimentale e clinico, negli ultimi anni le nuove terapie non hanno portato giovamenti rilevanti in termini di sopravvivenza media. Il fallimento delle attuali terapie è attribuito alla presenza, all'interno della massa tumorale, di una sottopopolazione di cellule con caratteristiche staminali, denominate *Brain Tumor Stem Cells* (BTSCs), responsabili della cancerogenesi, della chemioresistenza e, in ultimo, della recidiva. Per sconfiggere questo tumore occorre, dunque, sviluppare dei trattamenti mirati in grado di depletare il *pool* di cellule staminali tumorali.

La scoperta dell'importanza delle alterazioni epigenetiche nei processi di cancerogenesi e progressione tumorale ha suggerito la possibilità di utilizzare composti in grado di modulare l'azione di enzimi coinvolti nella regolazione epigenetica e nel *chromatin remodelling*, sfruttando la reversibilità delle modificazioni epigenetiche per ripristinare l'originario e fisiologico stato epigenetico della cellula.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di verificare e caratterizzare gli effetti antineoplastici di acido valproico (VPA) e resveratrolo (RSV), due farmaci che agiscono a livello epigenetico, su linee di cellule staminali tumorali da GBM. Il VPA, utilizzato da tempo in clinica per altri fini, è un inibitore delle istone deacetilasi di classe I e IIA, mentre il RSV è un attivatore della sirtuina I, una deacetilasi istonica di classe III. A tal fine sono state indagate l'attività metabolica, tramite *MTT assay*, e l'indice mitotico dopo somministrazione indipendente dei due farmaci. Successivamente, è stato eseguito uno studio morfologico per evidenziare eventuali variazioni della morfologia cellulare indotte dall'esposizione ai due farmaci in studio. In seguito, gli effetti differenziativi, determinati soltanto dal VPA, sono stati caratterizzati tramite immunofluorescenza, verificando l'espressione di marcatori specifici di staminalità e differenziamento neurale.

Inoltre, attraverso il saggio di migrazione *Wound Healing Assay* è stato valutato l'effetto dei due farmaci sulla motilità cellulare, un aspetto cruciale dal punto di vista clinico.

Infine, è stata indagata, tramite *Real time PCR*, la capacità del VPA e del RSV di modificare l'espressione di geni del *pathway* molecolare di Wnt, il quale è implicato nella regolazione della proliferazione, del differenziamento e della motilità cellulare.

Materiali e metodi

1. Linee cellulari

Presso il laboratorio di Genetica Medica del dipartimento di Chirurgia e Medicina Interdisciplinare dell'Università Bicocca, sono state analizzate sette linee (GBM2, GBM7, GBM04, G144, G166, G179 e GliNS2) di cellule staminali tumorali di GBM (denominate anche glioma stem cells, GSCs), la cui origine è descritta nei lavori di Griffero, Pollard e Piccirillo (Griffero et al., 2009; Pollard et al., 2009; Piccirillo et al., 2009). Inoltre, nel febbraio 2013, il gruppo di cui faccio parte ha pubblicato sulla rivista PLOS ONE una dettagliata caratterizzazione genomica ed epigenomica di queste linee (Baronchelli et al., 2013).

Tutte le linee cellulari trattate sono state isolate da pazienti affetti da glioblastoma multiforme, ad eccezione della linea G179, derivata da un particolare tipo di glioblastoma, detto GBM a cellule giganti.

2. Farmaci

Le sette linee cellulari prese in considerazione sono state trattate con acido valproico (*Sigma Aldrich*) utilizzato sotto forma di sale di sodio (sodio valproato). È stata preparata una soluzione madre 0,5 M sciogliendo la polvere (P.M.= 166,2 g/mol) in acqua sterile. Lo stock ottenuto è stato quindi suddiviso in aliquote, conservate a -20°C e scongelate al momento dell'uso. L'acido valproico è stato inoculato nelle colture cellulari alle concentrazioni finali di 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM, 6 mM, 10 mM e 20 mM.

Le linee staminali tumorali a nostra disposizione sono state trattate indipendentemente anche con resveratrolo. Per questo secondo farmaco è stata realizzata una soluzione madre 100 mM sciogliendo la polvere (P.M.=228,24 g/mol) in DMSO. Lo stock ottenuto è stato conservato a -20°C in provette stagnolate poiché il resveratrolo è fotosensibile. Le colture cellulari sono state trattate con resveratrolo alle concentrazioni finali di 10 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM. Le soluzioni d'uso sono state allestite diluendo la soluzione madre nel terreno di coltura.

3. Colture cellulari

Le cellule staminali tumorali derivate da GBM sono state coltivate e propagate in flask T-25 cm² in terreno privo di siero, specifico per la crescita di cellule staminali neurali, costituito da DMEM/F-12 (*Euroclone*) e Neurobasal (*Invitrogen*) in rapporto 1:1.

Per favorire l'espansione delle cellule staminali e, allo stesso tempo, mantenere il loro stato indifferenziato, al mezzo di coltura sono stati addizionati i fattori di crescita ricombinanti umani EGF (Epidermal Growth Factor) (*Miltenyi Biotec*) e bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (*Miltenyi Biotec*), rispettivamente alle concentrazioni di 20 ng/ml e 10 ng/ml. E' stato dimostrato, infatti, che entrambi questi fattori di crescita *in vitro* hanno un effetto mitogeno su precursori di tipo neurale. Al terreno di coltura sono stati aggiunti il supplemento B-27 senza vitamina A (*Invitrogen*), L-glutammina 2 mM, 20 UI/ml di penicillina e streptomycin 20 µg/mL (*Euroclone*).

Le cellule tumorali staminali di GBM possono essere mantenute in coltura in sospensione o in adesione. Le linee cellulari GBM7, G144, G166, G179 e GliNS2 crescono in adesione, perciò sono state coltivate in flask rivestite di laminina (*Invitrogen*) estratta dal sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm, che favorisce l'ancoraggio delle cellule al fondo del supporto di coltura e ne favorisce la crescita, mentre le linee GBM2 e GBM04 crescono in sospensione o semi-adesione.

La laminina è stata aggiunta al terreno di coltura ad una concentrazione di 10 µg/ml e le flask vengono mantenute in agitazione per 60' al fine di permettere che il substrato possa rivestirne il fondo. Le colture cellulari sono state incubate a 37°C in termostato (5% CO₂, 95% umidità). Lo stato delle colture è stato monitorato quotidianamente al microscopio a contrasto di fase. Per consentire una crescita cellulare ottimale, ogni 3-5 giorni una parte del terreno è stata sostituita con terreno fresco. Tale procedura elimina cataboliti ed eventuali detriti cellulari e fornisce nuovi nutrienti alle cellule.

In condizioni di coltura ottimali le cellule staminali neurali e le cellule staminali tumorali cerebrali tendono a formare degli aggregati sferici -detti neurosfere- capaci di autorigenerazione e multipotenzialità.

In media dopo 7-14 giorni dalla semina, a seconda della linea cellulare considerata, le colture sono state passate in subcultura, avendo raggiunto uno stato di semiconfluenza.

Le cellule che crescono in sospensione sono state semplicemente prelevate dalla flask; nel caso delle linee cellulari in adesione è stato necessario l'utilizzo della tripsina, un

enzima in grado di staccare le cellule dal fondo del supporto di crescita. Le cellule, incubate con tripsina 0,05% (*Euroclone*) per 3 minuti, sono state centrifugate e lavate con PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) al fine di eliminare i residui dell'enzima. In seguito, le neurosfere sono state disgregate mediante l'utilizzo di micropipetta p200 e passate in siringa con ago G26 per ottenere una sospensione monocellulare.

La sospensione cellulare ottenuta viene quindi suddivisa in più flask (rivestite con laminina o meno a seconda della linea cellulare), in numero variabile a seconda della quantità di cellule disponibili e delle necessità sperimentali, contenenti terreno fresco in modo da favorire la crescita e l'espansione delle colture.

Nel caso in cui si voglia procedere con il congelamento, la sospensione cellulare, addizionata con l'agente crioprotettivo DMSO (10%), deve essere trasferita in una provetta criogenica. Tale provetta dovrà essere mantenuta in un contenitore con isopropanolo a -80°C fino al giorno seguente ed in seguito verrà trasferita in azoto liquido. Quando sarà necessario utilizzare tale coltura cellulare, la provetta crioprotettiva sarà prelevata dall'azoto liquido e lasciata scongelare in ghiaccio per evitare che il cambiamento di temperatura sia troppo repentino. Una volta che la sospensione cellulare sarà completamente scongelata si effettueranno due lavaggi con PBS1X mediante centrifugazione, per eliminare tutto il DMSO, tossico per le cellule a temperatura ambiente. Infine le cellule saranno seminate in flask con 5 ml di terreno fresco.

Al fine di favorire il differenziamento delle cellule tumorali staminali è stato utilizzato il terreno RPMI-1640 (*EuroClone*), addizionato di siero fetale bovino al 10% (FBS, *Biological Industries*), L-glutamina 2 mM, penicillina 20 UI/ml (*EuroClone*) e streptomycin 20 µg/ml (*EuorClone*). In presenza di questo mezzo di coltura infatti le cellule staminali tumorali di GBM tendono a differenziare in cellule del *lineage* neurale: acquistano una morfologia differente, aderiscono alla piastra e perdono la loro capacità autorigenativa.

4. Conteggio cellulare

Per poter utilizzare una quantità definita di cellule in ciascun esperimento, è necessario valutare con precisione la concentrazione cellulare della coltura in uso. A tal fine è stata effettuata la conta cellulare con emocitometro e colorazione Trypan blue. Il Trypan blue

è il colorante più diffuso per discriminare le cellule vive da quelle morte. Esso è in grado di colorare selettivamente le cellule morte (blu). Ciò dipende dall'estrema selettività della membrana cellulare: le cellule vive, avendo la membrana cellulare intatta, non permettono la penetrazione di questo colorante nel citoplasma o lo espellono attivamente tramite pompe di efflusso; al contrario, nelle cellule morte, questo penetra facilmente rendendole distinguibili con una rapida osservazione al microscopio. Il Trypan blue non è, però, in grado di distinguere le cellule apoptotiche da quelle necrotiche. Questo metodo è largamente impiegato poiché è semplice, rapido, economico e necessita solo di una piccola aliquota della coltura in esame. Tuttavia, trattandosi di una tecnica non automatizzata, la stima può essere influenzata dall'interpretazione soggettiva dell'operatore.

Le cellule utilizzate, nello studio proposto, sono state raccolte, centrifugate a 1000 rpm e risospese in 1 ml di terreno completo. 10 µl di sospensione cellulare sottoposta a disaggregazione meccanica (tramite l'utilizzo di micropipetta p200 e passaggio forzato in siringa con ago G26) sono stati aggiunti a 10 µl di Trypan blue (soluzione 0,4%, Sigma).

Della miscela così ottenuta, 10 µl sono stati depositati nell'intercapedine tra la lastrina, sulla quale è inciso un reticolo come riferimento per la conta, e il vetrino coprioggetto dell'emocitometro (o camera di Burkner). La conta, effettuata al microscopio a contrasto di fase distinguendo tra cellule vive (traslucide) e cellule morte (blu), è stata eseguita sulle cellule presenti lungo una diagonale del reticolo (12 quadrati piccoli in totale); per evitare stime in eccesso o in difetto sono state contate tutte le cellule all'interno del singolo quadrato più quelle che toccano due dei suoi quattro lati. Infine è stata calcolata la concentrazione cellulare per unità di volume utilizzando la seguente formula:

$$\text{cell/ml} = (\text{media delle cellule contate nei quadrati piccoli}) \times 2 \times 2,5 \times 10^5$$

che tiene conto del fattore di diluizione (1:1) e del volume dei quadrati.

5. Saggio di vitalità cellulare: *MTT assay*

La valutazione del numero di cellule vitali e della loro capacità proliferativa *in vitro* è fondamentale per studiare l'effetto citotossico/citostatico di potenziali farmaci antitumorali. Nel corso degli anni sono stati sviluppati una serie di metodi finalizzati alla misura di questi parametri e basati su criteri diversi.

La vitalità delle sette linee cellulari a nostra disposizione è stata studiata attraverso il saggio MTT. L'MTT è un saggio colorimetrico che valuta il numero di cellule vitali e la loro capacità proliferativa in relazione alla funzionalità mitocondriale. Il saggio valuta, quindi, la capacità del sistema mitocondriale succinato-tetrazolio riduttasi di metabolizzare il sale di tetrazolio MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], che è di colore giallo, in formazano, un composto di colore blu-violetto, il quale si accumula nelle cellule sotto forma di granuli.

Una volta solubilizzato, il prodotto ottenuto può essere facilmente quantificato mediante spettrofotometro. Poiché la riduzione enzimatica si verifica soltanto all'interno delle cellule metabolicamente attive, il livello di formazano risulta direttamente proporzionale al numero di cellule vitali. Occorre considerare che in condizioni di coltura non ottimali, la risposta delle cellule vive può variare considerevolmente a seconda del loro stato metabolico.

Data l'elevata sensibilità di questo metodo, l'esperimento è stato allestito in piastre da 96 pozzetti. Questo formato permette, infatti, di analizzare numerosi campioni simultaneamente e rapidamente e, inoltre, richiede una quantità minima di cellule e di terreno. Le cellule sono state seminate alla concentrazione di $2-4 \times 10^4$ cellule/pozzetto e incubate per 24h a 37°C. Il giorno successivo le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni dei farmaci in studio, mantenendo un pozzetto di controllo non trattato. In particolare, è stata studiata la vitalità delle sette linee cellulari di GBM dopo trattamento con valproato, alle concentrazioni di 0,5-1-3-6-10-20 mM, e resveratrolo, alle concentrazioni di 10-50-100 e 200 µM. Per entrambi i farmaci considerati, il saggio MTT è stato eseguito in triplicato e in almeno due esperimenti indipendenti, per tre diversi tempi di trattamento (24, 48 e 72 ore).

Trascorso il tempo di trattamento farmacologico ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di soluzione MTT, ottenuta sciogliendo la polvere di MTT (*Sigma*) nel terreno di mantenimento in modo da ottenere una concentrazione finale pari a 0,5 mg/ml. Dopo 3 ore di incubazione, i granuli di formazano sono stati sciolti utilizzando etanolo assoluto e spipettando vigorosamente. Si è ottenuto, così, un composto violaceo di intensità proporzionale alla quantità di prodotto formatosi.

Infine è stata effettuata la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 595 nm con l'aiuto di un lettore di piastra FLUOstar Omega (*BMG Labtech*). Per valutare l'efficacia del farmaco, è stata calcolata la percentuale di sopravvivenza delle

cellule[(assorbanza del campione trattato/assorbanza del controllo) x 100]. E' stato, così, possibile tracciare la curva dose-risposta. I risultati riportati sono la media dei valori ottenuti da due differenti esperimenti svolti almeno in triplicato.

6. Allestimenti di preparati cromosomici e indice mitotico

Le linee cellulari a nostra disposizione sono state sottoposte ad un'indagine citogenetica finalizzata alla determinazione dell'indice mitotico. L'indice mitotico, che esprime la frazione (o percentuale) di cellule in mitosi in una data popolazione cellulare, è stato calcolato considerando il numero di metafasi riscontrate su 1000 nuclei contati. Un valore elevato di questo parametro è indice di una spiccata attività replicativa delle cellule tumorali. In particolare, tale analisi è stata effettuata sia su colture non trattate farmacologicamente, che su colture trattate con VPA 2mM e RSV 100µM per 48h.

Al raggiungimento dello stato di semi-confluenza, il Colcemid (*Roche*), una preparazione farmacologica contenente colchicina in grado di bloccare le cellule in fase M, viene aggiunto alla coltura cellulare in oggetto ad una concentrazione e per un tempo di incubazione (generalmente da 3h a 16h) variabili e dipendenti dalla linea cellulare. Tali condizioni vengono stabilite tramite ripetuti tentativi sperimentali, nonché monitorando il tempo di crescita delle cellule. Terminato il periodo di incubazione, la sospensione viene trasferita in una provetta conica da 15 ml e centrifugata a 2000 rpm per 10'. Dopo aver eliminato con cautela il surnatante, il pellet viene risospeso in 5 ml di soluzione ipotonica costituita da KCl 0,56% (ottenuta sciogliendo 0,56 g di KCl in 100 ml di H₂O distillata) per 15' a temperatura ambiente, in modo da provocare il rigonfiamento e la rottura delle cellule; dopo aver aggiunto 1ml di fissativo (acido acetico:alcool metilico, 1:3), per abituare gradualmente le cellule all'ambiente acido, la sospensione viene centrifugata a 2000 rpm per 7'. Il surnatante viene eliminato e il pellet risospeso in 5 ml di fissativo per 15', al termine dei quali si centrifuga nuovamente la sospensione. Il trattamento con fissativo consente la lisi delle cellule ed il rilascio del loro nucleo. Dopo l'eliminazione del surnatante, il pellet è nuovamente risospeso in 5 ml di fissativo fresco. A questo punto, mediante pipetta Pasteur si depositano poche gocce della sospensione cellulare su un vetrino inumidito con H₂O distillata, preventivamente sgrassato in etanolo assoluto e risciacquato in H₂O di fonte; il vetrino asciutto viene osservato al microscopio a contrasto di fase per

valutare la presenza e la qualità delle metafasi. I vetrini con i preparati cromosomici vengono lasciati “invecchiare” per un giorno a temperatura ambiente e, quindi, colorati con una soluzione di mostarda di Quinacrina (5 mg/ml in tampone Mc Ilvaine) per qualche secondo. Il fluorocromo si lega in modo stechiometrico al DNA, preferenzialmente in zone ricche di AT, formando complessi fluorescenti. Le metafasi vengono osservate al microscopio a fluorescenza (*Nikon Eclipse 80i*), selezionandole lungo il vetrino con obiettivo 20X.

7. Analisi della morfologia cellulare

Per evidenziare le modificazioni morfologiche indotte dalla somministrazione di acido valproico o resveratrolo nelle sette linee cellulari tumorali di GBM, è stata eseguita un'analisi morfologica delle cellule in coltura. Le cellule staminali tumorali di GBM sono state seminate ad una concentrazione differente in base al tempo di duplicazione di ciascuna linea e alla lunghezza del periodo di trattamento. Per ogni linea sono stati allestiti quattro esperimenti: 1) un controllo negativo con il terreno costituito da D-MEM/F12 e Neurobasal 1:1; 2) una coltura per ciascuna concentrazione di VPA (1-2-3-6-10 mM) nel medesimo terreno (D-MEM/F12 e Neurobasal 1:1); 3) una coltura per ciascuna concentrazione di resveratrolo (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M) e per ogni tempo di trattamento, essendo questo farmaco fotosensibile, nel medesimo terreno (D-MEM/F12 e Neurobasal 1:1); 4) un controllo positivo del differenziamento con terreno RPMI-10% FBS. Le cellule trattate con RSV e VPA sono state analizzate dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento; le cellule trattate con VPA sono state analizzate anche dopo 14 e 30 giorni di incubazione. Le cellule mantenute in terreno RPMI-10% FBS sono state analizzate dopo 14 e 30 giorni di coltura. Per l'analisi morfologica le cellule sono state osservate al microscopio a contrasto di fase e fotografate a diversi ingrandimenti.

8. Immunofluorescenza

Nello studio proposto l'immunofluorescenza è stata eseguita attraverso il metodo indiretto su 6 linee cellulari staminali di GBM: cinque trattate con VPA 2 mM (GBM2, GBM04, G144, G179 e GliNS2) e una trattata con VPA 1 mM (G166) per 14 e 30. L'effetto prodifferenziativo del VPA sulle CSCs da GBM è stato analizzato

considerando marcatori specifici sia per il mantenimento della staminalità che per il differenziamento nei diversi *lineages* neurali. Tale studio era già stato eseguito dopo 72 ore di trattamento con VPA 2 mM su tutte e sette le linee di GBM a disposizione. I marcatori di staminalità testati sono CD133, una glicoproteina transmembrana tipica delle BTSCs e delle cellule staminali ematopoietiche e neurali, e Nestina, una proteina citoplasmatica dei filamenti intermedi espressa dai precursori neurali. Per il differenziamento neurale è stata testata l'espressione di GFAP, una proteina citoplasmatica filamentosa tipica degli astrociti, della β III tubulina, una proteina citoplasmatica tipica del differenziamento neuronale, e di MBP, una proteina basica di membrana tipica degli oligodendrociti.

Gli esperimenti sono stati, pertanto, effettuati utilizzando i seguenti anticorpi:

Anticorpi primari:

- Anticorpo policlonale anti-CD133 prodotto in coniglio (*Santa Cruz Biotechnology*, diluizione 1:50)
- Anticorpo monoclonale anti-Nestina prodotto in topo (*Millipore*, diluizione 1:50)
- Anticorpo policlonale anti-GFAP prodotto in coniglio (*DakoCytomation*, diluizione 1:200)
- Anticorpo policlonale anti- β III tubulina prodotto in coniglio (*Covance*, diluizione 1:100)
- Anticorpo policlonale anti-MBP prodotto in capra (*Santa Cruz Biotechnology*, diluizione 1:50)

Anticorpi secondari:

- Alexa Fluor 488-conjugated Goat Anti-mouse IgG, green (*Invitrogen*, diluizione 1:200)
- Alexa Fluor 488-conjugated Goat Anti-rabbit IgG, green (*Invitrogen*, diluizione 1:200)
- Alexa Fluor 488-conjugated Donkey Anti-goat IgG, green (*Invitrogen*, diluizione 1:200)

Per eseguire il saggio di immunofluorescenza le cellule sono state fatte crescere adese ad un vetrino coprioggetto adagiato sul fondo del pozzetto. Su ciascun vetrino è stata seminata la quantità desiderata di cellule in base al tempo di duplicazione di ciascuna

linea e alla lunghezza del periodo di trattamento. Trascorso il tempo di trattamento sono stati effettuati due lavaggi rapidi in PBS 1X, lavorando delicatamente per non staccare le cellule. Successivamente i vetrini sono stati incubati con paraformaldeide 4% per 15' a temperatura ambiente allo scopo di fissare le cellule e preservarne la struttura. Una volta effettuati 3 lavaggi da 5' ciascuno con PBS 1X le cellule sono state trattate con glicina 0.1 M (in PBS) pH 7.5 per 10' a temperatura ambiente: ciò consente di tamponare le cariche positive ed eliminare l'autofluorescenza basale. In seguito è stata effettuata un'incubazione per 30' a temperatura ambiente in Blocking buffer (PBS 1X, 5% BSA, 0.6% Triton X-100); la BSA serve per bloccare i siti aspecifici ai quali potrebbero legarsi gli anticorpi per interazione idrofobica, falsando i risultati. I vetrini trattati con l'anticorpo diretto contro MBP e i controlli negativi Anti-Goat sono stati incubati con Blocking buffer allo 0.05% di Triton.

Poichè i nuclei vengono marcati con ioduro di propidio, il quale si lega agli acidi nucleici, è stato eseguito un trattamento con RNasi 70 U/mg (*Sigma*) 1:30 in Blocking buffer per 30 minuti a temperatura ambiente. Infine i vetrini, ad esclusione dei tre controlli negativi (Anti-Rabbit, Anti-Goat, Anti-Mouse), sono stati incubati overnight con l'anticorpo primario.

Il giorno successivo sono stati eseguiti 6 lavaggi da 5' in Washing buffer (PBS 1X, 0.3% Triton X-100) su tutti i campioni, ad eccezione dei vetrini incubati con anticorpo anti-MBP e i controlli negativi anti-goat che sono stati trattati con PBS 1X, per eliminare la quota di AbI non legata o legata in maniera aspecifica. In seguito, i vetrini sono stati incubati per un'ora a temperatura ambiente in camera umida e al buio con l'anticorpo secondario. Sono stati utilizzati, inoltre, lo ioduro di propidio (diluizione 1:10) per visualizzare i nuclei delle cellule e la falloidina (*Invitrogen*, Alexa Fluor 647-conjugated phalloidin, far red, diluizione 1:200) per osservare i filamenti di actina che costituiscono il citoscheletro. E' necessario evitare l'esposizione alla luce per preservare la funzionalità del fluorocromo coniugato all'anticorpo secondario.

Dopo aver effettuato 6 lavaggi da 5' ciascuno in PBS 1X i vetrini sono stati montati sui portaoggetto con Polyvinyl alcohol mounting medium (*Fulka Analytical*). I vetrini, sigillati con lo smalto, sono stati conservati al buio a 4°C fino al momento dell'osservazione con microscopio confocale a fluorescenza Radiance 2100 (*Bio-Rad*, Hercules, CA, USA). Per ogni vetrino sono state analizzate 100 cellule. Le immagini sono state acquisite utilizzando il filtro Kalman che consente una buona riduzione del

rumore di fondo. La sovrapposizione o *merge* delle immagini ottenute è stata eseguita con Adobe Photoshop CS6 Extendend versione 13.0.

9. Saggio di migrazione cellulare: *Wound healing assay*

Il *Wound Healing Assay* è un test sviluppato per la valutazione *in vitro* della migrazione cellulare. Esso prevede la creazione di un solco, detto *scratch*, su un monostrato confluyente di cellule, il monitoraggio dello stesso a intervalli di tempo regolari, in seguito alla somministrazione di diverse concentrazioni del farmaco d'interesse, ed, infine, la comparazione ed analisi delle immagini raccolte. In questo modo è possibile valutare l'effetto di farmaci d'interesse, a diverse concentrazioni e tempi di trattamento, sulla capacità di migrazione delle cellule.

Il *Wound Healing Assay* è stato eseguito su 6 linee di cellule staminali tumorali da GBM (GBM2, GBM04, G179, GliNS2, G144, GBM7) trattate con diverse concentrazioni di VPA (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM) e resveratrolo (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M). Per entrambi i farmaci alle diverse concentrazioni e per tutte le linee cellulari considerate, lo *scratch* è stato monitorato a tre tempi di trattamento (48h, 72h e 96h).

Inizialmente, è stato eseguito un *coating* con laminina per ogni pozzetto al fine di far aderire le cellule, seminate in terreno standard. Una volta ottenuto un *monolayer* cellulare, è stato eseguito un lavaggio in PBS 1X e le cellule sono state, infine, incubate per 24 ore a 37°C (*starvation time*) in terreno standard senza fattori di crescita, al fine di arrestare la proliferazione cellulare. Trascorso il tempo di incubazione, è stato eseguito lo *scratch* con l'uso di un puntale per p1000. In seguito, dopo aver eseguito due lavaggi con PBS 1X, è stato ripristinato il terreno senza fattori di crescita. Dopo aver fotografato lo *scratch* (t0), è stato inoculato il farmaco, mantenendo un pozzetto di controllo non trattato. Lo *scratch* è stato nuovamente fotografato ai tempi di trattamento desiderati (tn). Le foto ottenute sono state analizzate calcolando le variazioni dell'area dello *scratch* ai vari tempi di trattamento (tn) rispetto all'area al tempo t0 e confrontando i dati così ottenuti con le rispettive variazioni visualizzate nel controllo. Le foto sono state analizzate con l'ausilio del software freeware TScratch (<http://www.cse-lab.ethz.ch/>).

10. Real time - PCR array

La real-time RT-PCR è una tecnica sensibile e affidabile che consente di analizzare l'espressione genica, attraverso l'amplificazione, ottenuta con reazione a catena della DNA-polimerasi, e la simultanea quantificazione del cDNA. Attraverso una reazione di retrotrascrizione si ottengono filamenti di cDNA che mantengono inalterati i rapporti relativi di concentrazione dei diversi RNA estratti. Il cDNA dopo ogni ciclo di amplificazione viene quantificato. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso di sonde, come SYBR Green, fluorescenti quando legano il DNA.

Nello studio presentato è stata eseguita un PCR array real time che combina le qualità della real-time PCR retrotrascrizionale con la capacità delle tecniche di microarray di rilevare contemporaneamente l'espressione di molti geni. Tale tecnica è molto utile per analizzare un pannello di geni correlati ad una stessa patologia o coinvolti in uno stesso *pathway* biologico.

Il PCR array è stato eseguito con il kit RT² Profiler PCR Array (*Qiagen*) in duplicato sulle tutte le linee cellulari dello studio trattate con VPA 2 mM o RSV 100 µM per 96h e non trattate per valutare eventuali variazioni dell'espressione di geni coinvolti nel *pathway* di Wnt in seguito alla somministrazione indipendente dei farmaci.

10.1 Estrazione dell'RNA

L'RNA è stato estratto dalle cellule attraverso il kit di estrazione RNeasy Mini kit (*Qiagen*), che sfrutta il legame specifico dell'RNA con una membrana di silice con permeabilità selettiva posta sul fondo di una colonnina. Tale membrana è in grado di trattenere fino a 100 µg di RNA. Il kit consente di selezionare, in particolare, molecole di RNA più lunghe di 200 nucleotidi, poiché gli RNA più corti (5.8S rRNA, 5S rRNA, e tRNAs) vengono eliminati durante i diversi passaggi, in quanto non sono trattenuti dalla membrana.

Le cellule (fino a 1×10^7) sono state raccolte e centrifugate a 300 x g per 5 minuti e il terreno di coltura è stato completamente eliminato. Successivamente sono state lisate attraverso l'aggiunta di 350 µl di buffer RLT che consente la rottura della membrana plasmatica e degli organelli cellulari e il conseguente rilascio di tutto l'RNA contenuto nel campione. Inoltre, il buffer di lisi contiene tiocianato di guanidina che inattiva le

RNasi, al fine di mantenere l'RNA intatto. Il lisato è stato trasferito in una colonnina (QIAshredder spin column, *Qiagen*) posta all'interno di una eppendorf ed è stato centrifugato per 2' a 13000 rpm, al fine di ridurre la viscosità. In seguito è stata aggiunta all'eluato una pari quantità di etanolo 70%. 700 µl di questa soluzione, così ottenuta, sono stati trasferiti in una nuova colonnina (RNeasy spin column) presentante sul fondo la membrana selettiva di silice e collocata sempre all'interno di una eppendorf. Il tutto è stato, quindi, centrifugato per 15'' a 800 x g e l'eluato è stato eliminato. Per lavare la membrana di silice sono state effettuate due centrifugazioni della durata di 15'' ciascuna a 8000 x g utilizzando come eluenti 700 µl di Buffer RW1 e 500 µl di buffer RPE. Infine è stata eseguita un'ultima centrifugazione della durata di 2 minuti a 8000 x g utilizzando come eluente 500 µl di buffer RPE per eliminare ogni traccia di etanolo che potrebbe interferire nei passaggi successivi. La colonnina è stata, poi, trasferita in una nuova eppendorf e l'RNA è stato eluito con 30-50 µl di acqua RNasi-free attraverso una centrifugazione di un minuto a 8000 x g.

La concentrazione e la purezza dell'RNA ottenuto sono state determinate misurando l'assorbanza del campione utilizzando un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (*Thermo-Scientific*). L'RNA purificato è stato dunque conservato a -80°C in acqua RNasi-free fino al momento dell'utilizzo.

10.2 Retrotrascrizione

L'RNA, estratto e purificato con il kit RNeasy Mini (*Qiagen*), è stato retrotrascritto a cDNA con il kit RT² First Strand (*Qiagen*).

Per ogni campione è stata preparata una mix di eliminazione del DNA genomico, costituita da RNA (1 µg), Buffer GE (2 µl) e acqua RNasi-free (volume variabile). La mix ottenuta è stata incubata per 5' a 42°C e poi trasferita per 1' in ghiaccio. Ad ogni campione sono stati aggiunti 10 µl di mix di retrotrascrizione, costituita da 4 µl di buffer BC3 5x, 1 µl di controllo P2, 2 µl di trascrittasi inversa RE3 e 3 µl di acqua RNasi-free. Le provette sono state incubate per 15' a 42°C e successivamente trasferite a 96°C per 5' al fine di bloccare la reazione di retrotrascrizione.

I campioni, ai quali sono stati aggiunti 91 µl di acqua RNasi-free, sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

10.3 PCR Array

L'array PCR per le linee GBM2 e G144 trattate con VPA 2 mM per 96h è stato effettuato in piastre da 96 pozzetti, di cui 84 contenevano primers per geni coinvolti nel *pathway* di Wnt e 5 primers per geni *housekeeping*. Dei sette pozzetti rimanenti, uno conteneva un controllo di DNA genomico (GDC), al fine di rilevare con elevata sensibilità eventuali contaminazioni da DNA genomico, 3 contenevano controlli di retrotrascrizione (RTC), per testare l'efficienza della reazione di retrotrascrizione, mentre i restanti 3 contenevano sequenze artificiali di DNA per testare l'efficienza della reazione a catena della polimerasi (PPC). Per un PCR array accurato e riproducibile è fondamentale evitare ogni contaminazione con DNA esterno. L'analisi d'espressione dopo trattamento con VPA 2 mM per 96 ore è stata successivamente estesa a tutte le altre linee, includendo anche il trattamento con RSV 100 μ M per 96 ore; sono stati utilizzati a tale scopo degli array PCR custom, contenenti 7 geni appartenenti al *pathway* di Wnt e coinvolti in punti diversi della cascata di trasduzione del segnale, selezionati in base ai risultati degli esperimenti precedenti. Si tratta dei geni WNT1 (ligando), FZD4 (recettore), CTNNB1 (effettore), EP300 (coattivatore trascrizionale), CREBBP (coattivatore trascrizionale), TCF7 (fattore di trascrizione) e MYC (gene target di β -catenina); inoltre, sono stati utilizzati i geni HPRT1 e TBP come *housekeeping*.

Per effettuare l'analisi di espressione dei geni è stata utilizzata la quantificazione con real time PCR con SYBR Green, un colorante che emette fluorescenza quando si lega in maniera non specifica al doppio filamento di DNA.

L'array PCR prevede, innanzitutto, la preparazione della mix necessaria costituita da 1350 μ l di RT2 SYBR Green Mastermix (*Qiagen*), 102 μ l di cDNA e 1248 μ l di acqua RNasi-free. La mix è stata, quindi, aliquotata nei 96 pozzetti della piastra (25 μ l per pozzetto) mantenuta in ghiaccio. Dopo aver sigillato i pozzetti con tappi di plastica trasparente che non interferisce con la lettura real time, la piastra è stata centrifugata a temperatura ambiente per 1' a 1000 x g, per eliminare eventuali bolle, ed è stata posta in un termociclatore per real time (*Applied Biosystems*) opportunamente programmato [Tab.2].

Cicli	Durata	Temperatura
1	10'	95°C
40	15"	95°C
	1'	60°C

Tabella 2. Programma di funzionamento per termociclatore Applied Biosystems.

Infine per ogni pozzetto è stato calcolato, attraverso un *software*, il ciclo soglia (C_T), cioè il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quella della linea soglia. Dopo che il termociclatore ha automaticamente stabilito la *baseline*, ovvero il ciclo al di sopra del quale è misurabile una variazione del segnale di fluorescenza, corrispondente all'accumulo di amplificato, è stata determinata manualmente, utilizzando la visualizzazione logaritmica delle curve di amplificazione, la linea soglia in grado di intersecare le curve di amplificazione di tutti i pozzetti nella fase esponenziale. Tale linea viene determinata come 3 deviazioni standard rispetto alla fluorescenza presente durante i primi cicli. E' importante mantenere lo stesso valore della linea soglia per tutti gli esperimenti eseguiti con lo stesso campione.

I valori dei cicli soglia sono stati analizzati attraverso il *software* PCR Array Data Analysis Template Excel (www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php), considerando che il numero dei cicli necessari perché un campione raggiunga il suo C_T è inversamente proporzionale alla quantità di cDNA presente inizialmente: a C_T più alto corrisponde una quantità iniziale di template più bassa perché sarà necessario un maggior numero di cicli di PCR per arrivare alla fluorescenza della soglia. L'analisi dei dati ottenuti è stata eseguita mediante il metodo ΔC_t . La quantificazione dell'espressione dell'mRNA di interesse viene calcolata come $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (fold-change). Il ΔC_t viene calcolato sottraendo il C_t del controllo endogeno, ovvero del gene *housekeeping* usato per normalizzare la quantità di campione analizzato in ogni reazione, al C_t dei geni d'interesse. Il $\Delta\Delta C_t$ viene calcolato sottraendo il ΔC_t del campione calibratore, a cui sono state rapportate le differenze di espressione dei geni d'interesse, identificato come valore 1 e costituito da cDNA ottenuto retrotrascrivendo RNA delle linee considerate non trattate, a quello del campione in studio (cDNA ottenuto retrotrascrivendo RNA delle linee trattate con VPA 2 mM o RSV 100 μ M per 96 ore). Il *fold-regulation* esprime i risultati relativi al *fold-change* in modo significativo da un punto di vista biologico. Se il *fold-change* è maggiore di uno il risultato indica

una *up-regolazione* e il *fold-regulation* è uguale al *fold-change*. Valori di *fold-change* minori di uno, invece, indicano una *down-regolazione* e il *fold-regulation* è l'opposto negativo del *fold-change*.

11. Western blot

Il western blot è una tecnica immunochimica che permette di identificare, quantificare e localizzare una determinata proteina mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. Le proteine, separate in funzione della massa attraverso elettroforesi denaturante, vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Qui, la proteina d'interesse può essere identificata attraverso l'utilizzo di anticorpi primari e anticorpi secondari opportunamente marcati.

Nello studio presentato, per eseguire il western blot, effettuato per valutare eventuali variazioni del livello o della localizzazione di β -catenina (90 kDa), sono stati utilizzati gli estratti proteici nucleari e citoplasmatici ottenuti dalle linee cellulari GBM2 e G144 trattate o non trattate con VPA 2 mM per 96h.

11.1 Estratti proteici citoplasmatici e nucleari

Le cellule, coltivate in *dish*, sono state lavate 2 volte con PBS per eliminare completamente il terreno di coltura. Successivamente, dopo essere state incubate per 5 minuti a temperatura ambiente con 1,5 ml di buffer detergente, sono state raccolte in falcon da 15 ml e centrifugate a 4°C a 300 x g per 4'. Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet, risospeso in 400 μ l di buffer A freddo, è stato trasferito in una eppendorf ed incubato per 15' in ghiaccio. Trascorso il tempo di incubazione il pellet, al quale sono stati aggiunti 10 μ l di Nonidet P-40 10%, è stato vortexato e centrifugato a 2800 x g per 4' a 4°C. Il surnatante così ottenuto, che costituisce l'estratto proteico citoplasmatico, è stato raccolto in eppendorf. Il pellet, risospeso in 40 μ l di buffer B freddo, è stato vortexato vigorosamente per 15' a 4°C e centrifugato a 1500 x g per 5'. Il surnatante ottenuto, che rappresenta l'estratto proteico nucleare, è stato raccolto in eppendorf.

Le proteine estratte sono state quantificate mediante il metodo Bradford, impostando il Nanodrop a una lunghezza d'onda di 595 nm; usando la albumina di siero bovino come

proteina standard, si è costruita una curva di taratura che ha permesso di determinare, per interpolazione, il valore del contenuto proteico totale del campione estratto.

Buffer detergente:

- NaCl 150 mM: 500 μ l
- EDTA pH 8.0 1 mM: 100 μ l
- TrisHCl pH 7.5 40 mM : 400 μ l
- Acqua bidistillata: 9 μ l

Buffer A:

- Hepes pH 7.9 10 mM: 10 μ l
- KCl 10 mM: 3.3 μ l
- EDTA 0,1 mM: 5 μ l
- DTT 1 mM: 5 μ l
- PMSF 0,5 mM: 10 μ l
- Cocktail inibitori proteasi 1%: 10 μ l
- Acqua bidistillata: 956 μ l

Buffer B:

- Hepes pH 7.9 20 mM: 20 μ l
- NaCl 0,4 M: 133 μ l
- EDTA 1mM: 50 μ l
- DTT 1 mM: 10 μ l
- PMSF 1 mM: 10 μ l
- Cocktail inibitori proteasi 1%: 10 μ l
- Acqua bidistillata: 767 μ l

11.2 Elettroforesi e trasferimento

La corsa elettroforetica è stata effettuata con l'apparato, Xcell Sure Lock (*Invitrogen*), utilizzando il gel commerciale della NuPAGE Novel Bis-Tris (4-12%) (*Invitrogen*). In ogni pozzetto del gel sono stati caricati 10 μ g di proteine in un volume massimo finale di 30 μ l. I campioni, precedentemente denaturati a 70°C per 10', sono stati preparati come segue:

- NuPAGE LDS Sample Buffer 4X: 7,5 μ l
- NuPAGE Reducing Agent 10X: 3 μ l
- estratto proteico : volume variabile a seconda della concentrazione
- acqua deionizzata: fino a volume finale di 30 μ l

In un pozzetto sono stati caricati 7 μ l di marcatore (Precision plus protein standard dual color, *Bio-Rad*). I campioni sono stati fatti correre per circa 1 ora a 200 Volt in presenza di running buffer MOPS 1X (buffer di corsa ottimale per la separazione di proteine ad alto peso molecolare), addizionato di antiossidante (500 μ l ogni 200 ml di running buffer, NuPAGE Antioxidant, *Invitrogen*) nella camera interna, e del solo running buffer MOPS 1X nella camera esterna.

Terminata la corsa elettroforetica, dopo aver estratto il gel dal supporto e aver eliminato l'estremità inferiore e la parte corrispondente ai pozzetti di caricamento, è stato effettuato il trasferimento su Nitrocellulose Transfer Membrane (*Whatman*). Il *sandwich* per il trasferimento composto, partendo dalla parte rivolta verso il catodo, da due spugnette, due fogli di carta 3mm, gel, filtro di nitrocellulosa, due fogli di carta 3mm e due spugnette, tutti imbevuti di transfer buffer, è stato collocato nell'apposito apparecchio (X Cell II Blot Module, *Invitrogen*). Il transfer buffer, inserito nella camera interna dell'apparecchio utilizzato per il trasferimento, è costituito da:

- transfer buffer 20X (*Invitrogen*): 10 ml
- metanolo: 30 ml
- NuPAGE Antioxidant (*Invitrogen*): 200 μ l
- Acqua deionizzata: 160 ml

Nella camera esterna è stata inserita acqua deionizzata.

Il passaggio tra i due elettrodi di una corrente pari a 30 V per 1h, in direzione perpendicolare al gel, ha provocato la migrazione delle proteine dal gel al foglio di nitrocellulosa.

Terminato il trasferimento, il filtro di nitrocellulosa è stato immerso in Rosso Ponceau. Questa contro-colorazione è utile per valutare l'efficienza del trasferimento, la presenza di bolle, evidenziare le *lanes* corse e la posizione delle proteine. Queste informazioni consentono di tagliare la membrana, ridefinire l'area utile e, eventualmente, separare le varie *lanes* destinandole a trattamenti diversi. Il filtro è stato, poi, lavato con acqua e TBS Tween (TBST) 0,1%, per eliminare completamente il colorante, e saturato con

latte 5% in TBST 0,1% per 1 ora sull'agitatore a temperatura ambiente per bloccare i siti aspecifici ai quali potrebbe legarsi l'anticorpo.

TBST 0,1%:

- TBS 1X (ottenuto partendo dalla soluzione madre TBS 5X): 500 ml
- TWEEN 20 (0,1%): 500 µl

TBS 5X (pH 7.4/7.6):

- NaCl: 40,1 g
- Tris (o Trizma) base: 12,1 g
- H₂O bidistillata: 900 ml

11.3 Ibridazione e detection

Dopo aver saturato la membrana sono stati effettuati tre lavaggi da 10' con TBST 0,1% per rimuovere completamente l'eccesso di latte. Successivamente la membrana è stata incubata *overnight* sull'agitatore a 4°C con l'anticorpo primario (Anticorpo monoclonale anti-β catenina prodotto in topo, *Santa Cruz Biotechnology*, diluizione 1:1000 in TBST 0,1%)

Dopo aver effettuato tre lavaggi da 10' con TBST 0,1%, la membrana è stata incubata, in agitazione, con l'anticorpo secondario (anti-mouse, *Pierce* 31450, diluizione 1:5000) per 1h e 30' a temperatura ambiente. Successivamente, eseguiti altri tre lavaggi da 10' con TBST 0,1% per rimuovere l'anticorpo secondario in eccesso, il segnale d'ibridazione è stato rilevato mediante metodo di sviluppo ECL (*Genespin*).

Il filtro di nitrocellulosa, infine, è stato utilizzato per impressionare una lastra fotografica (lastra *Hyperfilm*), attraverso una "soluzione di sviluppo" e una "soluzione di fissaggio", al fine di rilevare la presenza della proteina d'interesse.

Come proteine endogene per normalizzare i dati ottenuti, sono state utilizzate l'actina, per la forma di β-catenina citoplasmatica, e la lamina a + c, per la forma di β-catenina nucleare, nel seguente modo:

Actina (42 kDa):

- Anticorpo primario: Anti-human actin (*Sigma*) 1:1500 in TBST 0,1%
- Incubazione: 1h a temperatura ambiente
- Lavaggi: 3 lavaggi di 10 minuti in TBST 0,1%
- Anticorpo secondario: anti rabbit 1:10000 in TBST 0,1%

- Incubazione: 1h30' a temperatura ambiente

Lamina a + c (70 kDa):

- Anticorpo primario Anti-lamina a+c (*Abcam*) 1:2000 in TBST 0,1%, 5% latte
- Incubazione: overnight a 4°C
- Lavaggi: 3 lavaggi di 10 minuti in TBST 0,1%
- Anticorpo secondario: anti mouse 1:5000 IN TBST 0,1%
- Incubazione: 1h30' a temperatura ambiente

11. Analisi statistica

L'analisi statistica mediante test di Fisher (immunofluorescenza e analisi della vitalità cellulare), test del Chi-quadro con correzione di Yates (indice mitotico) e test del t-Student (migrazione cellulare e western blot) è stata effettuata sui dati grezzi utilizzando un foglio di lavoro di Microsoft excel. Sono stati considerati significativi i confronti con *p-value* inferiore a 0.05.

Risultati

1. Effetti del trattamento con VPA o RSV sull'attività metabolica

Al fine di determinare se i due farmaci in oggetto di studio potessero avere un effetto inibitorio sull'attività metabolica delle linee di GSCs, sono stati eseguiti dei saggi di vitalità cellulare (MTT assays). I dati di seguito riportati sono espressi come percentuale di sopravvivenza rispetto al controllo non trattato. Per entrambi i farmaci sono state testate concentrazioni crescenti per 24, 48 e 72 ore di trattamento per verificare se l'eventuale variazione nell'attività metabolica fosse dose e tempo dipendente. I test sono stati effettuati in triplicato, in almeno due esperimenti indipendenti. Infine, è stata effettuata un'analisi statistica sui dati grezzi tramite *t test* [Tab.S1].

Nei trattamenti con concentrazioni crescenti di VPA (0.5-1-3-6-10-20mM) per 24 ore si è generalmente assistito ad un modesto decremento della percentuale di cellule metabolicamente attive, in particolare alle concentrazioni più elevate. Nel caso della linea GBM2, è stata registrata la maggior riduzione della vitalità, pari al 30% ($p < 0,0001$). Anche le linee G179 e GBM04 si sono dimostrate responsive al trattamento in modo dose-dipendente, mostrando una riduzione massima pari al 17% e al 25% ($p < 0,0001$), rispettivamente. Le restanti linee, invece, non sono risultate particolarmente sensibili al VPA e la loro vitalità non è mai scesa al di sotto dell'86% [Fig.10-A]. Il trattamento per 48 ore ha mostrato una rilevante riduzione dell'attività metabolica via via più marcata all'aumentare della concentrazione farmacologica soltanto nella linea GBM2, con valori di vitalità che compresi tra il 70% del trattamento a 1mM ($p < 0,001$) al 22% di quello a 20mM ($p < 0,0001$). Anche nella linea GBM04 è stata osservata una riduzione della vitalità, benchè meno consistente rispetto alla linea GBM2 (dal 90% del trattamento a 1mM fino al 50% di quello a 20mM). Per quanto riguarda le altre linee, la percentuale di cellule metabolicamente attive non va mai al di sotto dell'80%, eccetto per quanto concerne il trattamento a 20mM nella linea G179 (70% circa) [Fig.10-B]. Gli effetti sull'attività metabolica della somministrazione di VPA per 72h sono stati particolarmente evidenti solo nelle linee GBM2 e G179: la concentrazione farmacologica pari a 20mM ha ridotto la vitalità fino al 10% ($p < 0,0001$) e al 33% ($p < 0,0001$), rispettivamente. Anche le restanti linee cellulari hanno mostrato una diminuzione dell'attività metabolica, ma solo alle concentrazioni maggiori di VPA. Da evidenziare è il comportamento della linea GBM04, la quale non ha modificato le proprie percentuali di vitalità in seguito al trattamento per 72 ore, presentando valori molto simili a quelli ottenuti dopo 48 ore di esposizione al farmaco [Fig.10-C].

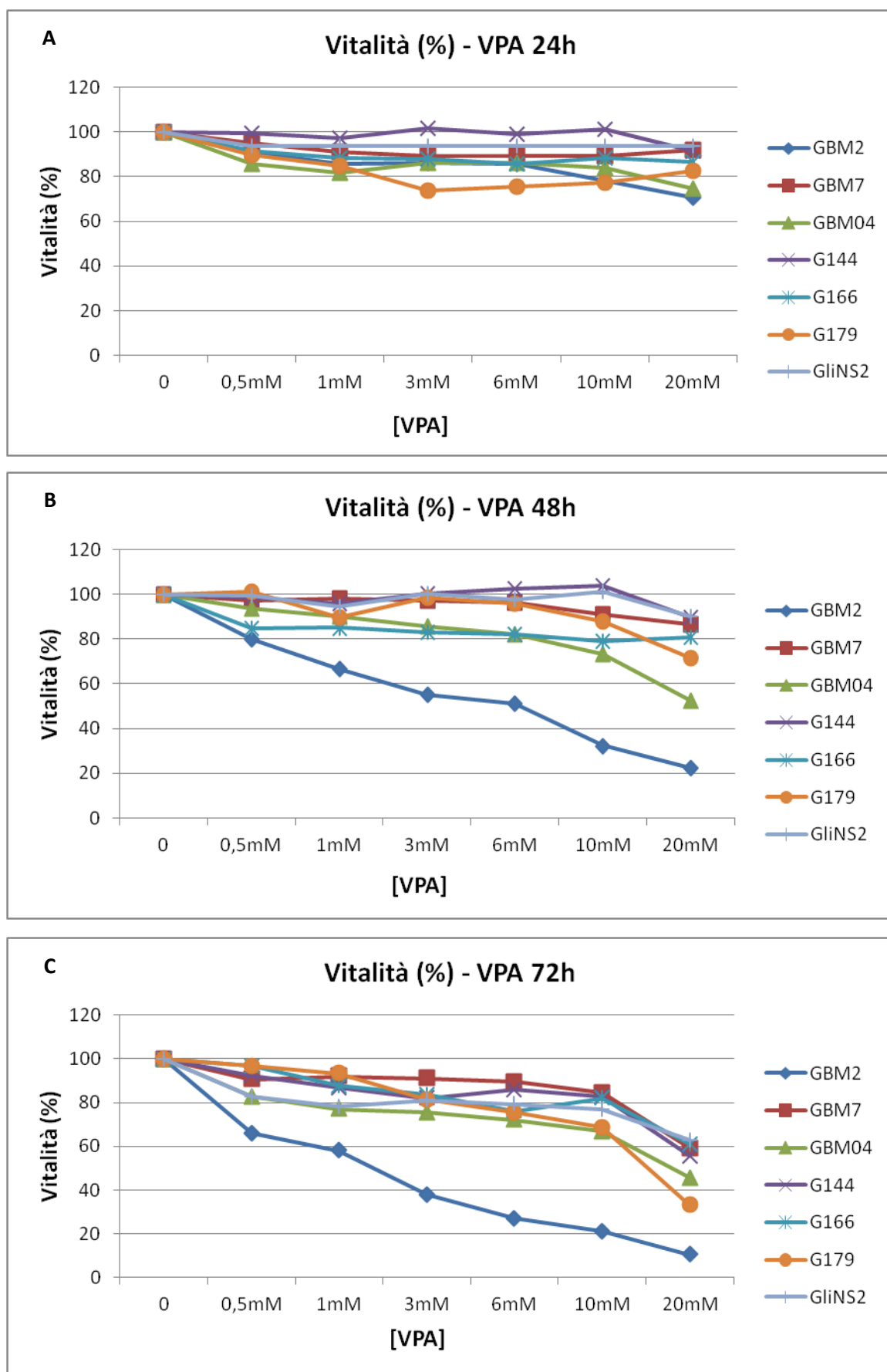


Figura 10. Variazioni della vitalità cellulare nelle linee di GSCs trattate con concentrazioni crescenti di VPA (0,5-1-3-6-10-20mM) per 24 (A), 48 (B) e 72 (C) ore. I dati sono derivati dalla media di due esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

Nel trattamento con dosi crescenti di RSV (10-50-100-200 μ M) per 24 ore, i valori di attività metabolica sono risultati pressoché inalterati a tutte le concentrazioni farmacologiche, mantenendosi vicini al 100% o, addirittura, superiori nel caso della linea GliNS2 [Fig.11-A]. Dopo 48 ore di trattamento, invece, abbiamo potuto osservare una riduzione dell'attività metabolica, passata dal 90% al 40-50% circa (RSV 200 μ M), nelle linee GBM2 ($p < 0,0001$), G179 ($p < 0,0001$), e GBM04 ($p < 0,0001$). Le linee G166 e G144 hanno mostrato variazioni modeste della percentuale di cellule metabolicamente attive, mediamente attorno all'85-90% (RSV 200 μ M), mentre per le linee GBM7 e GliNS2 è stato osservato un aumento dei valori di vitalità [Fig.11-B]. L'esposizione al RSV per 72 ore ha determinato una riduzione progressiva dell'attività metabolica nella linea GBM2 (30%, $p < 0,0001$) e G179 (30%, $p < 0,0001$), mentre la linea GBM04 non sembra ulteriormente risentire del prolungamento del trattamento, presentando ancora una volta un comportamento simile a quello mostrato per le 48 ore di esposizione. Le restanti linee cellulari (G144, GBM7, GliNS2 e G166) non sono risultate responsive [Fig.11-C].

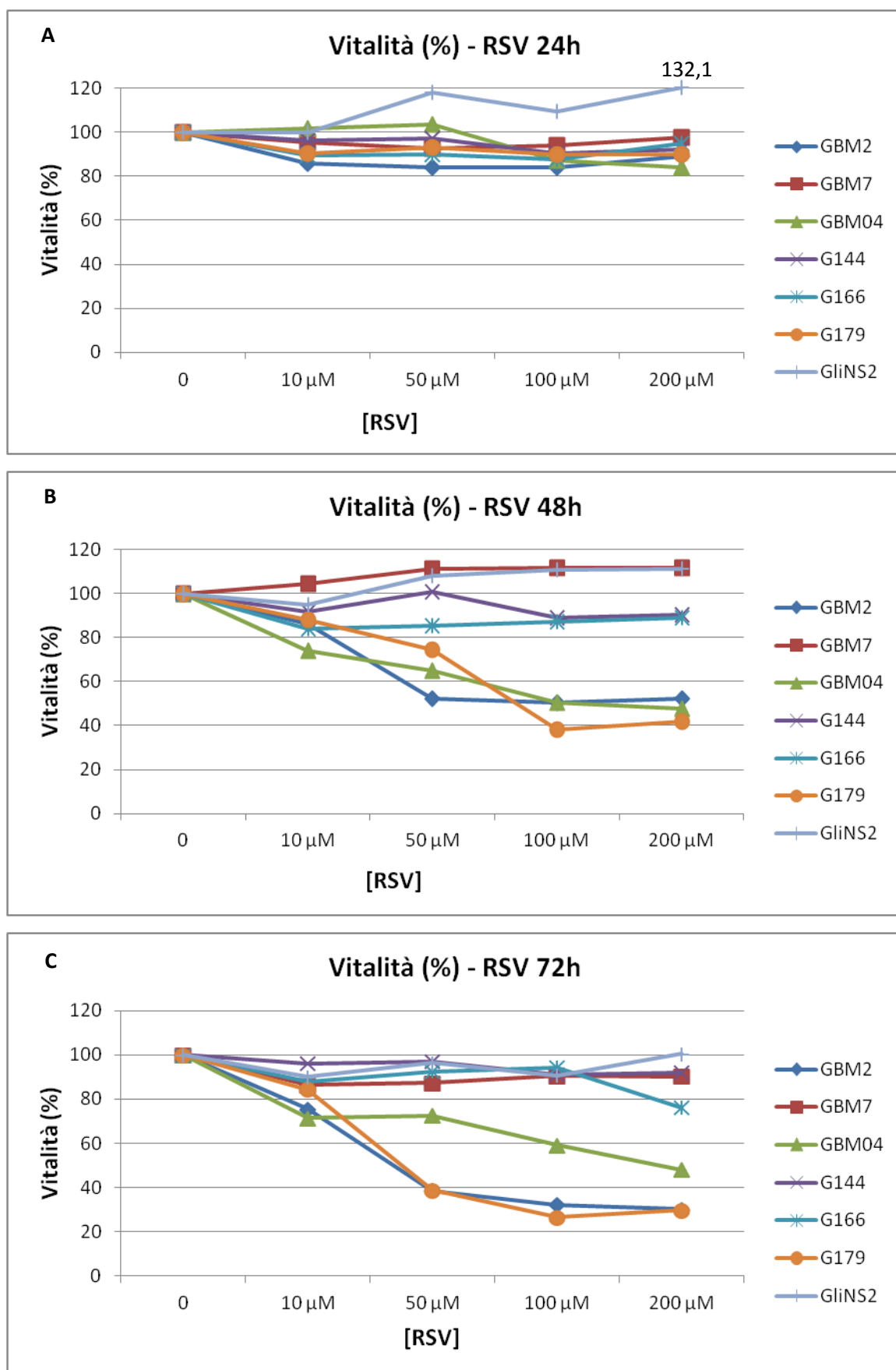


Figura 11. Variazioni della vitalità cellulare nelle linee di GSCs trattate con concentrazioni crescenti di RSV (10-50-100-200μM) per 24 (A), 48 (B) e 72 (C) ore. I dati sono derivati dalla media di due esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

2. Analisi dell'indice mitotico dopo trattamento con VPA o RSV

Per ciascun campione è stato stimato l'indice mitotico attraverso il conteggio del numero di metafasi presenti ogni 1000 nuclei, al fine di determinare se i due farmaci testati fossero in grado di influenzare la proliferazione cellulare. Per determinare se le differenze riscontrate rispetto al CTRL fossero o meno statisticamente significative, è stato eseguito il test del *Chi-quadro* (χ^2) con correzione di Yates, stabilendo un valore limite di significatività pari a $p < 0,05$. I risultati dell'analisi sono riportati in Figura MI.

Complessivamente, la somministrazione di VPA 2mM per 48 ore ha determinato una notevole riduzione dell'indice mitotico in tutte le linee esaminate. Tale diminuzione è risultata statisticamente significativa in tutte le linee ($p < 0,01$ per la linea G179, $p < 0,0001$ per le linee GBM2, G144, G166, G179), ad eccezione della linea GBM7, in cui il suddetto decremento è stato meno evidente anche in virtù della minore attività mitotica di base [Fig.12].

Trattando le cellule con RSV 100 μ M per 48h è possibile apprezzare una diminuzione statisticamente significativa ($p < 0,0001$) dell'indice mitotico nelle linee GBM2, G144, G166, G179 e GliNS2; in particolare, è da segnalare il totale azzeramento dell'indice mitotico registrato nelle linee GBM2 e G179. L'unica eccezione da questa tendenza è rappresentata dalla linea GBM7, la quale ha mostrato un modesto aumento dell'indice mitotico a seguito del trattamento con RSV, che, tuttavia, non è risultato statisticamente significativo [Fig.12].

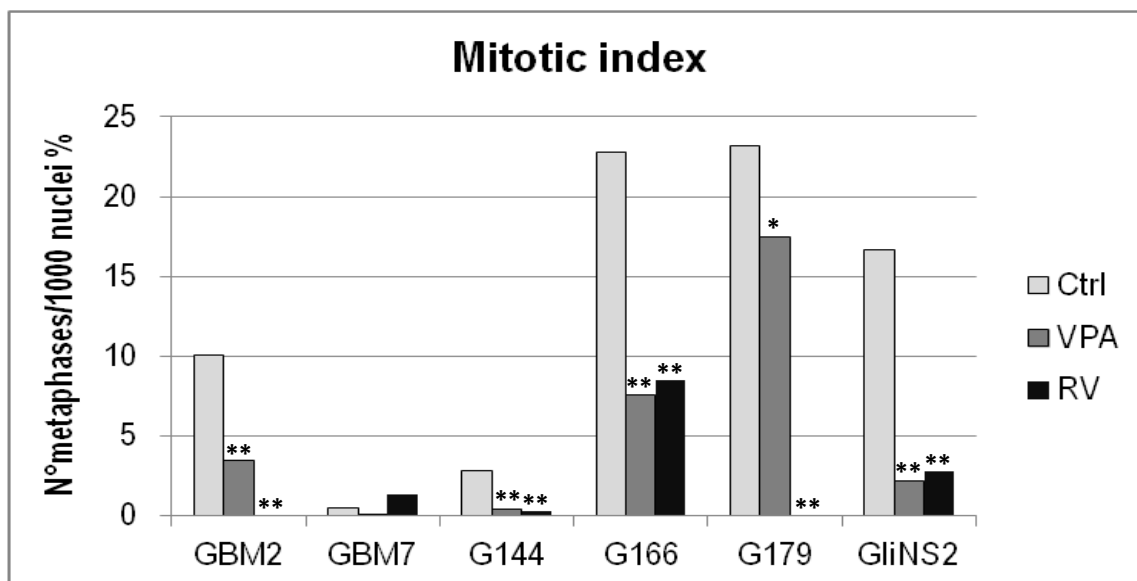


Figura 12. Gli istogrammi rappresentano l'indice mitotico di sei linee di GSCs, espresso come n° di metafasi su 1000 nuclei in percentuale. Tale analisi è stata eseguita su campioni di controllo non trattati e su campioni trattati con VPA 2 mM o RSV 100 μ M per 96 ore. L'analisi statistica è stata eseguita con test del *Chi-quadro* (χ^2) con correzione di Yates (* $p < 0,01$; ** $p < 0,0001$).

3. Analisi della morfologia cellulare dopo trattamento con VPA o RSV

Al fine di evidenziare l'insorgenza di eventuali modificazioni nella morfologia cellulare provocate dalla somministrazione indipendente dei due farmaci a diverse concentrazioni, è stata eseguita un'analisi morfologica sulle sette linee staminali tumorali da GBM a nostra disposizione dopo 14 e 30gg di trattamento con VPA e dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento con RSV, confrontandole con colture di controllo non trattate. Le cellule non trattate hanno la morfologia tipica delle cellule staminali neurali e risultano aggregate in ammassi sferici in sospensione, detti “neurosfe” [Fig.13].

Come “controlli positivi” della capacità di differenziare da parte delle cellule utilizzate in questo studio, sono state utilizzate le stesse linee cellulari coltivate in RPMI-10% FCS, medium in grado di indurre il differenziamento grazie alla presenza di siero fetale bovino. Dopo 14 giorni e 30 giorni di crescita in tale medium, in tutte le linee si sono riscontrate variazioni nella morfologia cellulare, indice di differenziamento. In particolare, si sono notate cellule dalla forma allungata e cellule con prolungamenti [Fig.14].

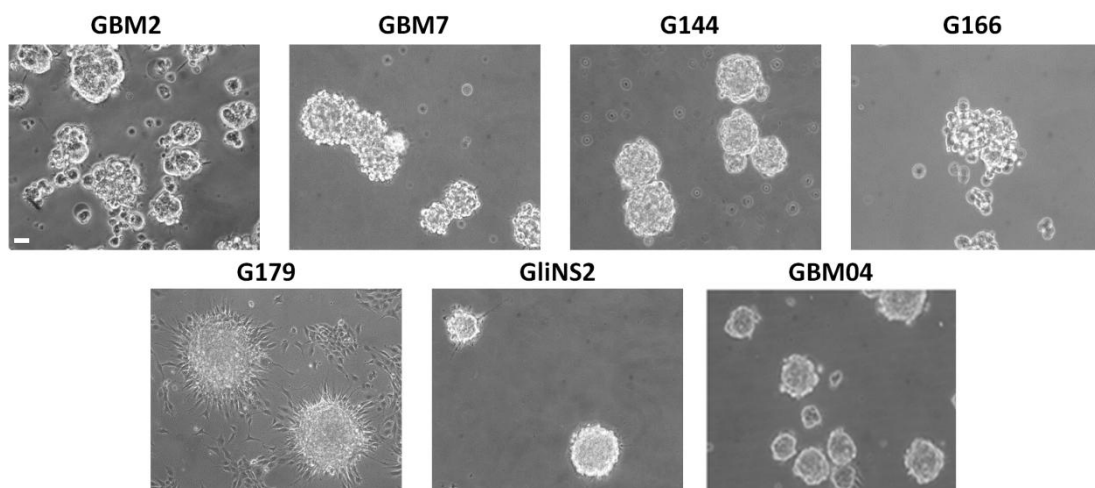


Figura 13. Morfologia tipica delle cellule staminali tumorali di GBM non trattate, coltivate in terreno standard: si noti la tipica aggregazione in ammassi sferici in sospensione, detti “neurosfe”. La barra bianca rappresenta 100 μ M.

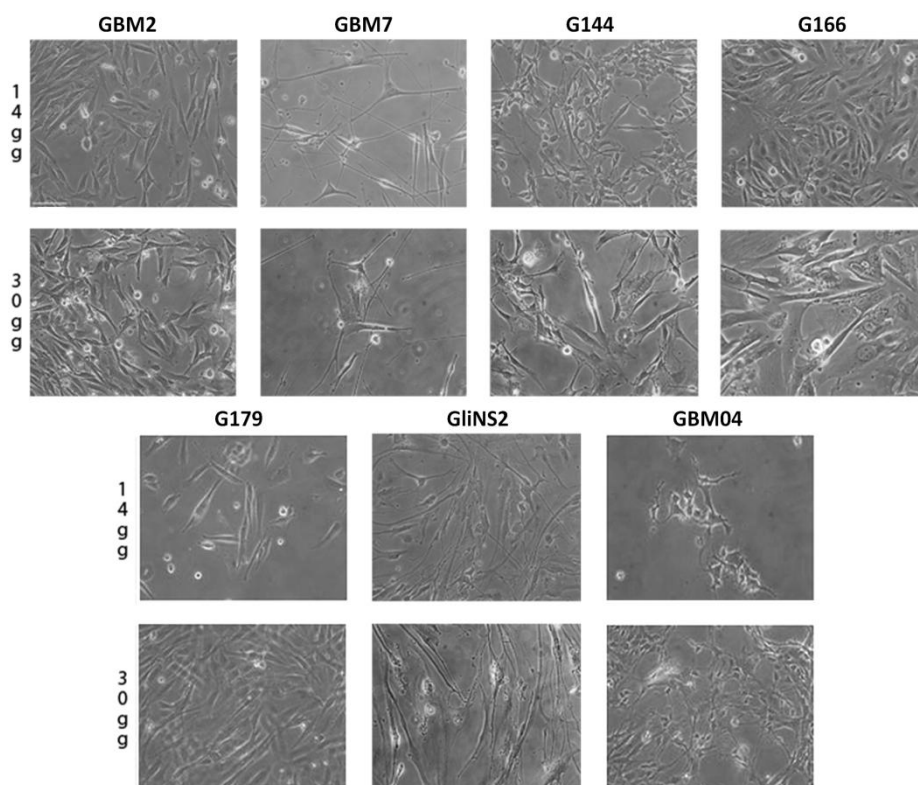


Figura 14. Valutazione delle modificazioni morfologiche indotte dalla crescita in terreno RPMI-10% FCS per 14 giorni e 30 giorni, in sette linee di cellule staminali tumorali di GBM. La linea bianca, presente nella prima foto, rappresenta 100 μ m.

Risultati pregressi a questa tesi, hanno dimostrato che tali colture cellulari, trattate con quattro diverse concentrazioni di VPA (2 mM, 3 mM, 6 mM, 10 mM) per 24, 48 e 72 ore, presentano importanti modificazioni morfologiche se confrontate con le colture di controllo non trattate. L'effetto prodifferenziativo del VPA si è manifestato in modo più evidente dopo 48 e 72 ore di trattamento: in tutte le linee si sono osservate, infatti, cellule con morfologia fusiforme o poligonale e cellule presentanti sottili estroflessioni. I cambiamenti morfologici sono evidenti soprattutto alle concentrazioni più basse (2-3 mM) del farmaco, poiché, a concentrazioni più elevate, a causa dell'effetto citotossico dello stesso, si osserva la presenza di cellule morte e detriti cellulari. [Fig.15]

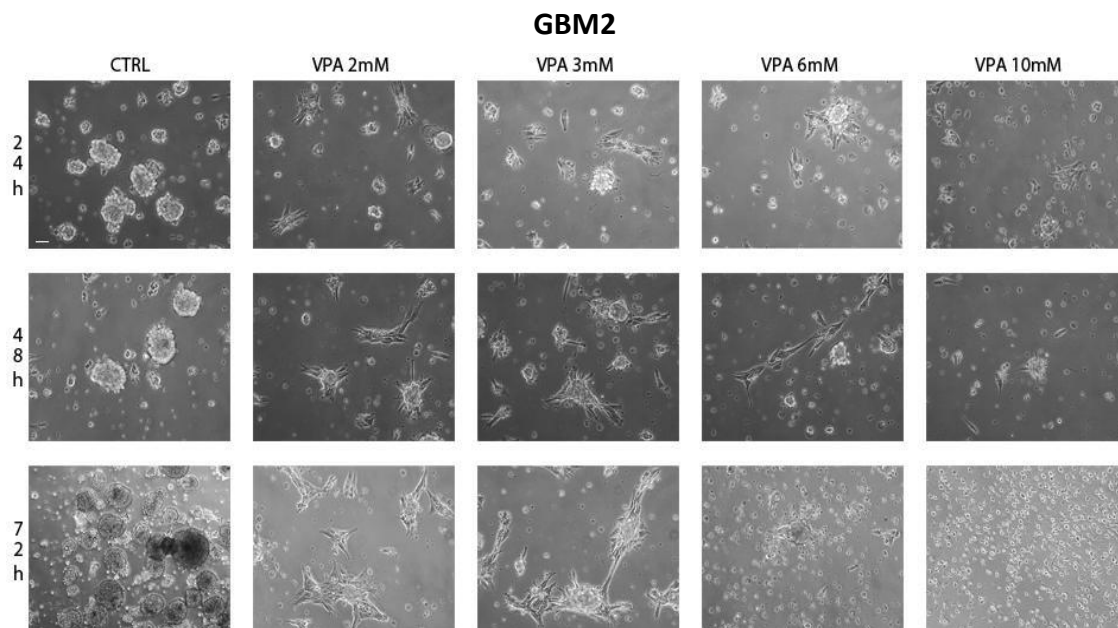


Figura 15. Immagine rappresentativa delle modificazioni morfologiche indotte dalla somministrazione di concentrazioni crescenti di VPA in cellule staminali tumorali di GBM della linea GBM2, a 24-48-72 ore dall'inoculo del farmaco. La linea bianca, presente nella prima foto, rappresenta 100 μ m.

Proseguendo tale studio, sono state valutate le modificazioni morfologiche indotte, nelle sette linee cellulari staminali di GBM, dal trattamento con VPA alla concentrazione di 2 mM per 14 e 30gg.

Dopo 14 giorni, ma soprattutto dopo 30 giorni dall'inoculo di VPA, l'effetto differenziativo si è mostrato in modo evidente: nella maggior parte delle linee si sono osservate cellule con morfologia fusiforme o poligonale e cellule presentanti sottili estroflessioni [Fig.16-A]. Le linee G166 e GBM7 hanno, invece, presentato una notevole quantità di cellule morte e detriti cellulari, dimostrando, così, la prevalenza dell'effetto citotossico del VPA dopo entrambi i tempi di trattamento (immagini non mostrate). Queste due linee cellulari sono state trattate, in seguito, con una concentrazione di farmaco più bassa, pari a 1 mM, per i medesimi tempi di trattamento. Le cellule della linea G166 hanno mostrato, dopo entrambi i tempi di trattamento, un cambiamento di morfologia, indice del potenziale prodifferenziativo del VPA, mentre le cellule della linea GBM7 sono risultate estremamente sensibili al trattamento prolungato con il farmaco anche a tale concentrazione, tant'è che nelle immagini si possono notare soltanto frammenti di cellule morte e detriti cellulari [Fig.16-B]. La linea GBM7, inoltre, ha mostrato un'elevata mortalità anche in seguito alla somministrazione di VPA alla concentrazione di 0.5 mM (dati non mostrati). Tale linea

è risultata evidentemente sensibile all'esposizione a lungo termine al VPA, anche a concentrazioni molto basse.

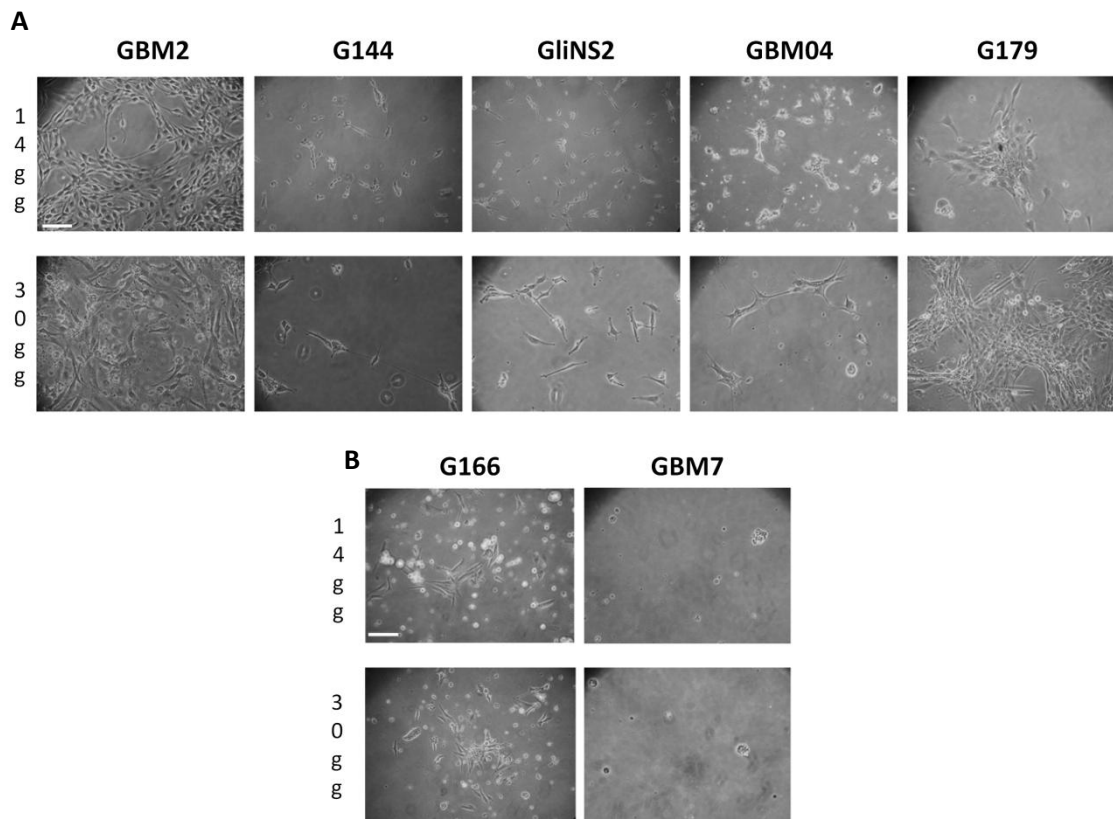
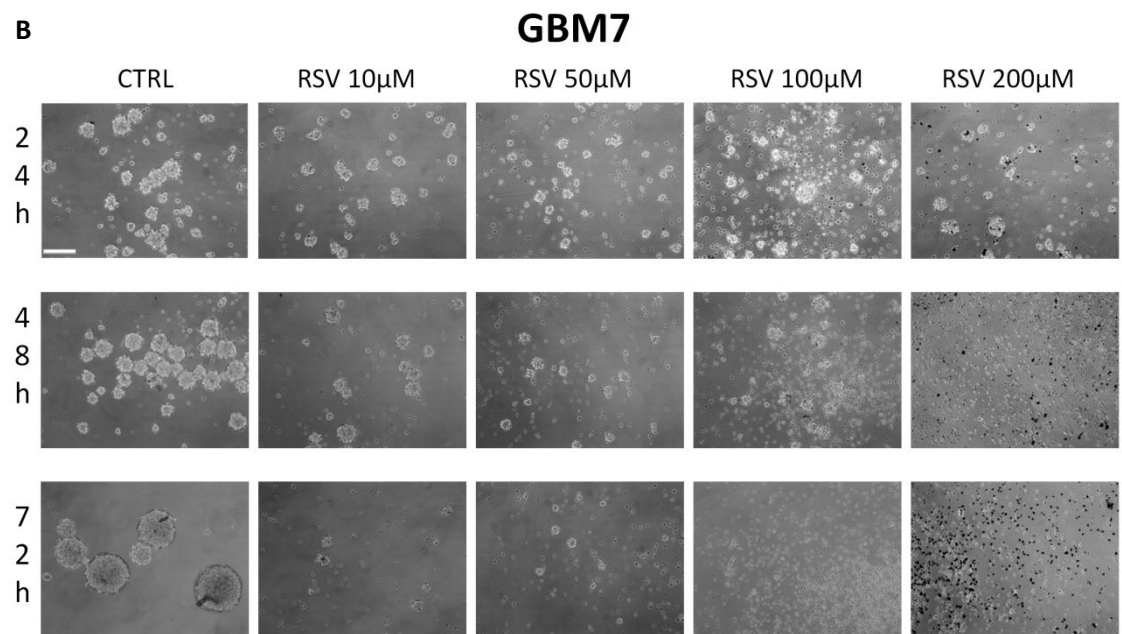
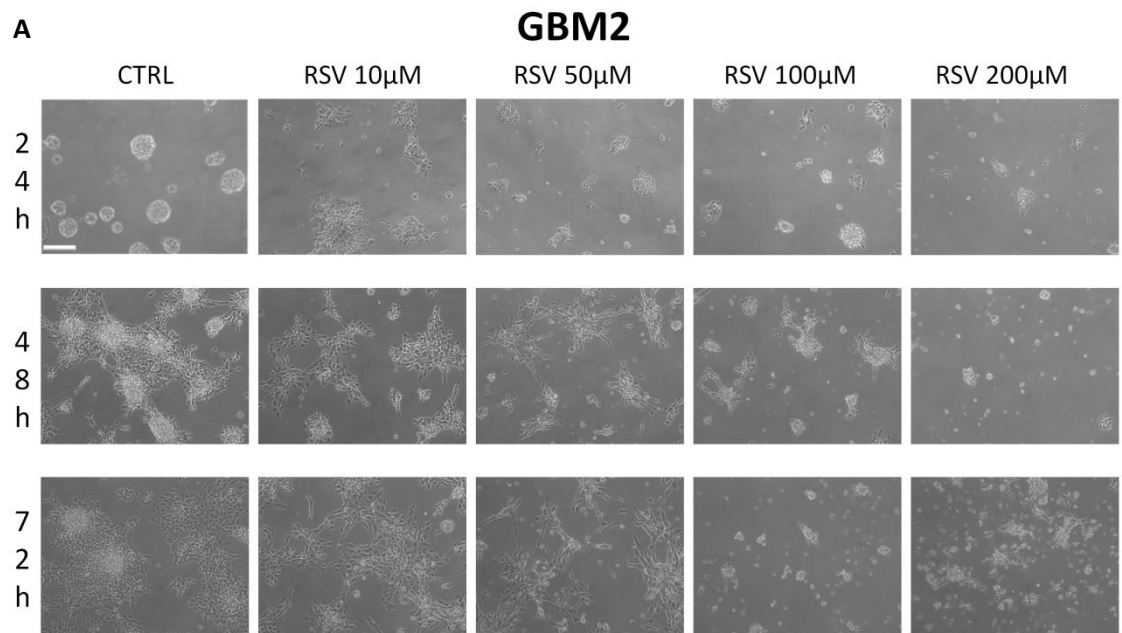
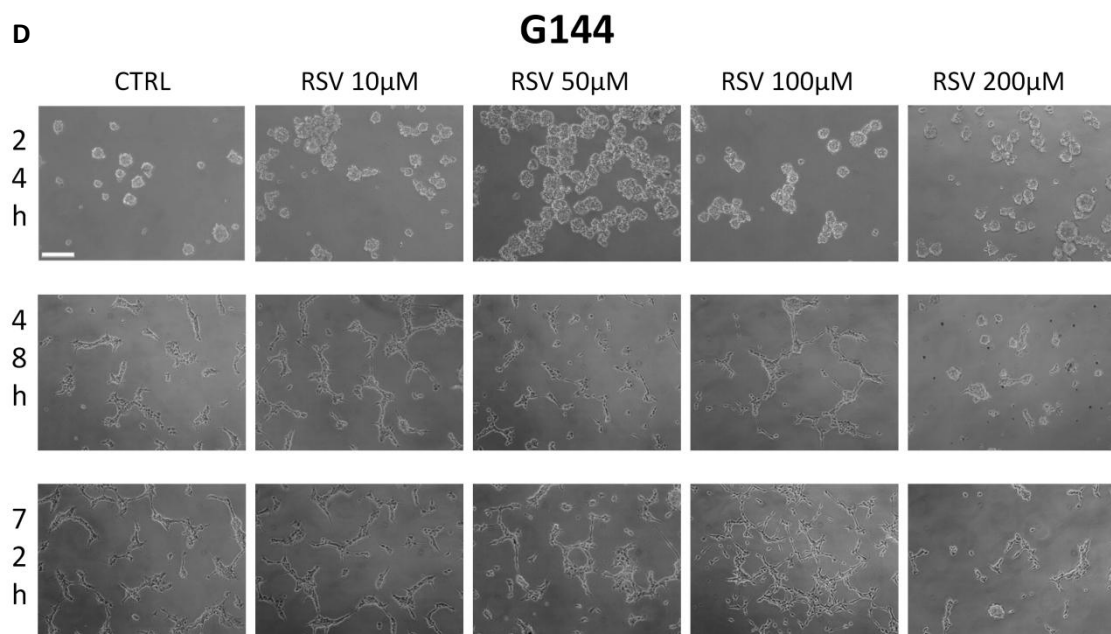
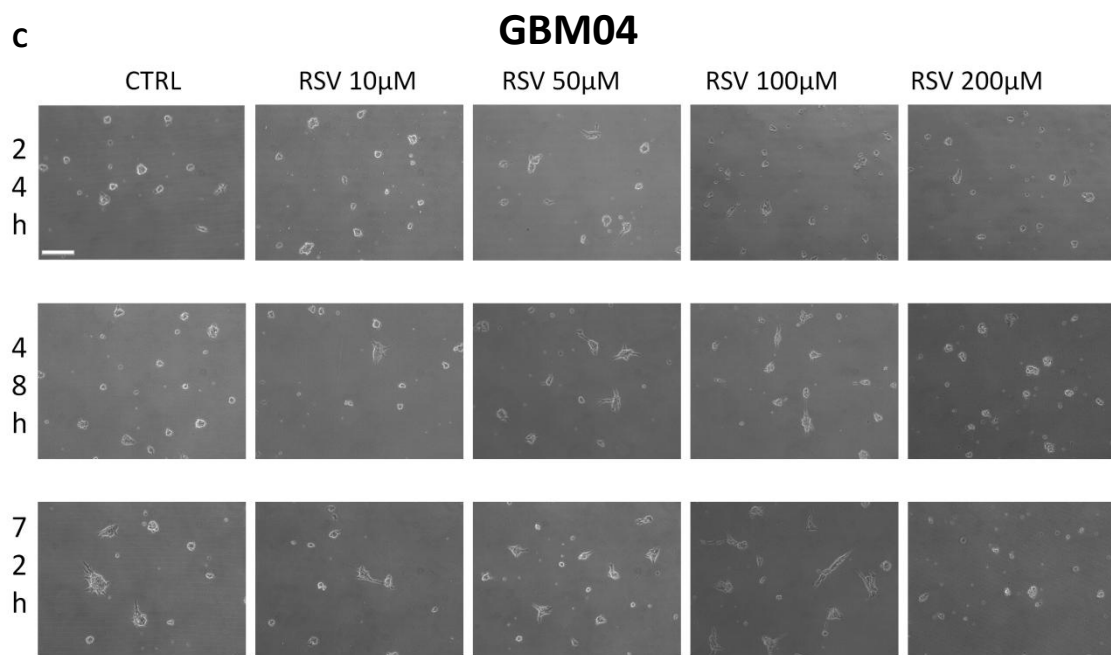
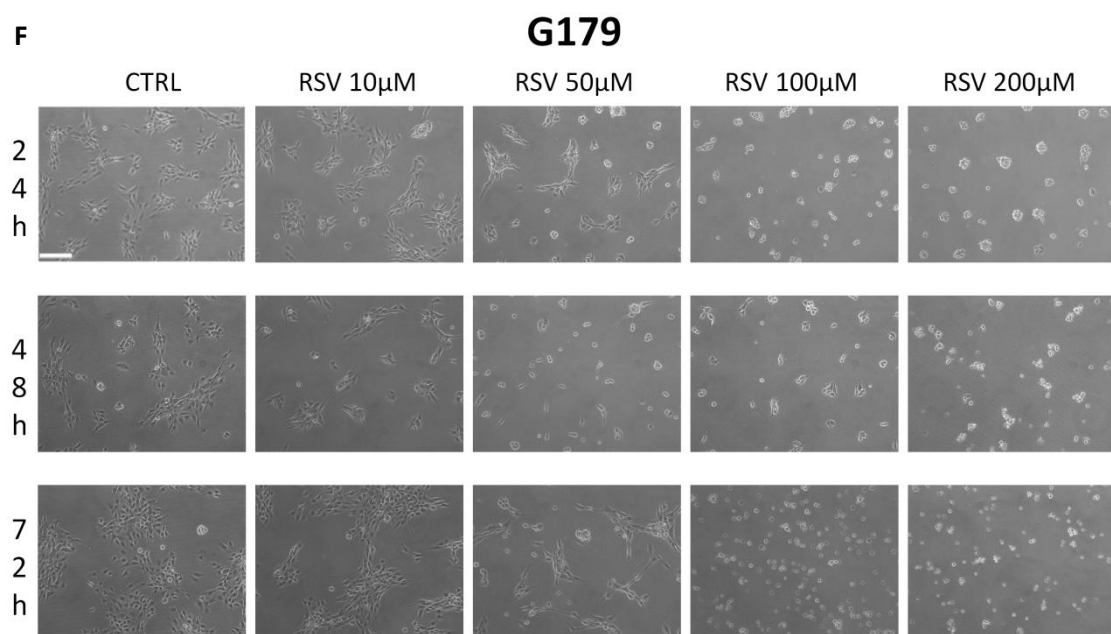
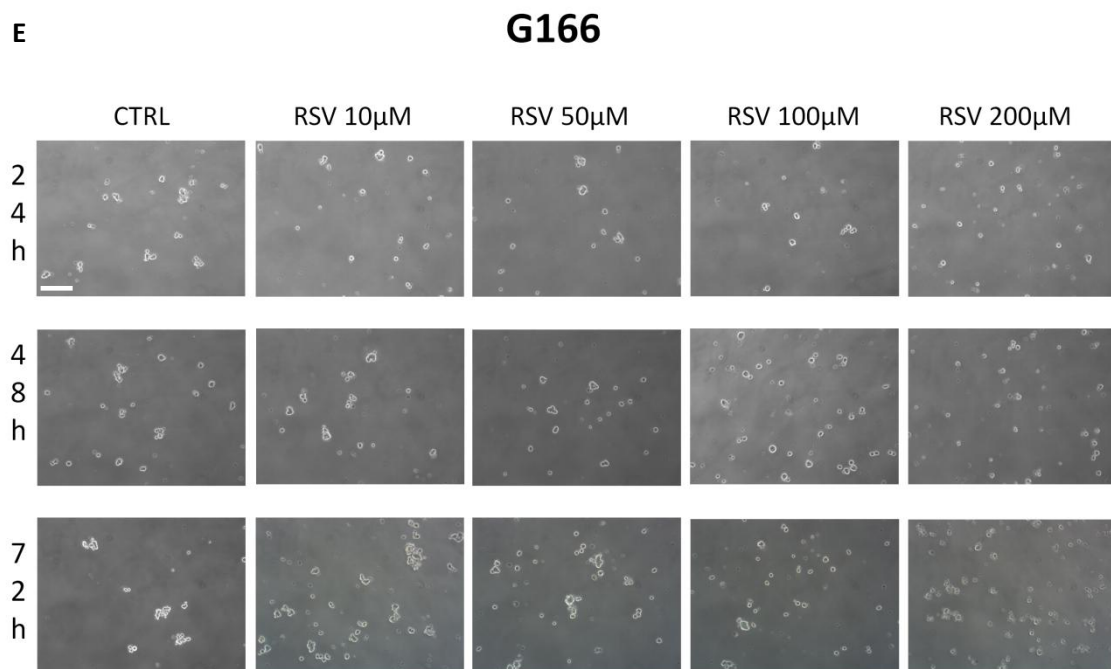


Figura 16. (A) Valutazione delle modificazioni morfologiche, indotte dalla somministrazione di VPA 2 mM, nelle linee GBM2, G144, GliNS2, GBM04 e G179 a 14 e 30 giorni dall'inoculo del farmaco. (B) Valutazione delle modificazioni morfologiche indotte dalla somministrazione di VPA 1 mM nelle linee G166 e GBM7 dopo 14 e 30 giorni dall'inoculo del farmaco. La linea bianca, presente nella prima foto, rappresenta 100 μ m.

Il trattamento delle sette linee di cellule staminali tumorali di GBM (GBM2, GBM7, GBM04, G144, G166, G179 e GLINS2) con quattro diverse concentrazioni di RSV (10-50-100-200 μ M) per 24, 48 e 72 ore non ha generalmente indotto modificazioni morfologiche significative. Soltanto le cellule della linea GBM2 hanno mostrato lievi cambiamenti della morfologia dopo 48 e 72 ore di trattamento. Le altre linee cellulari non hanno presentato differenze morfologiche apprezzabili tra controlli e trattamenti farmacologici. Le linee cellulari G179, GliNS2 e GBM7 mostrano, alla concentrazione più elevata di farmaco, cellule morte, indice dell'aumento dell'effetto citotossico del farmaco [Fig.17].







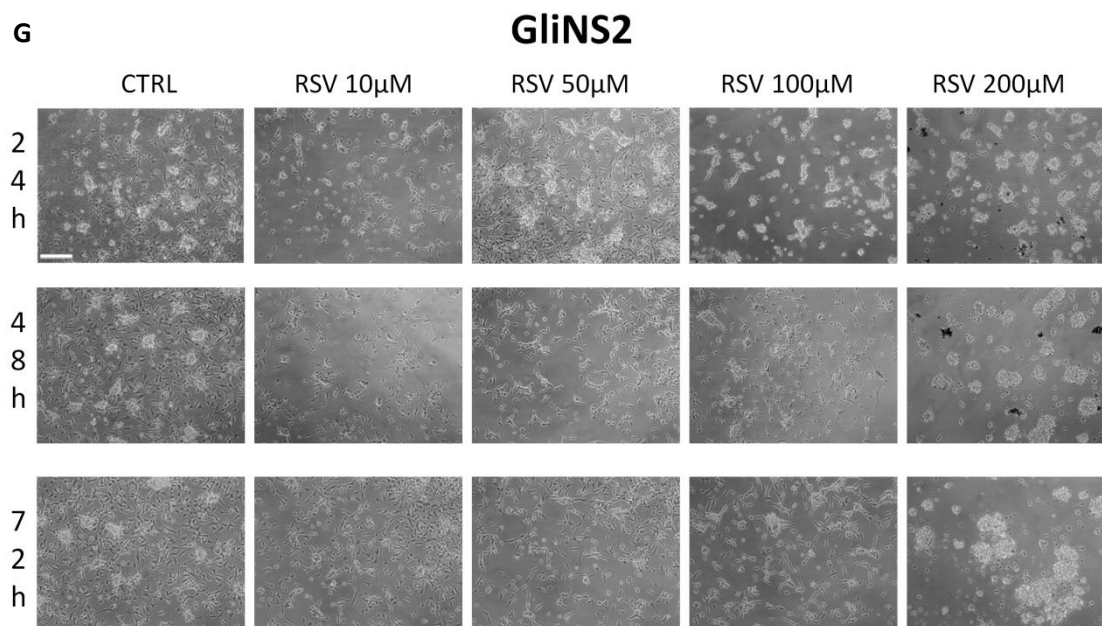


Figura 17. Studio delle modificazioni morfologiche indotte dalla somministrazione di concentrazioni crescenti di RSV in cellule staminali tumorali di GBM della linea GBM2 (A), GBM7 (B), GBM04 (C), G144 (D), G166 (E), G179 (F) e GLINS2 (G) a 24-48-72 ore dall'inoculo del farmaco. La linea bianca, presente nella prima foto, rappresenta 100 μ m.

4. Studio dell'espressione di marcatori di staminalità e differenziamento neurale dopo trattamento prolungato con VPA

Per caratterizzare a livello molecolare gli effetti differenziativi indotti dal trattamento prolungato con VPA sulle sette linee di cellule staminali tumorali da GBM a nostra disposizione, sono stati eseguiti diversi esperimenti di immunofluorescenza (IF). Uno studio pregresso nel nostro laboratorio, eseguito durante il mio *stage* di tesi di laurea magistrale, aveva già evidenziato mediante IF che dopo trattamento per 72 ore con VPA 2 mM o crescita in terreno addizionato con FCS per 14 e 30 giorni, che fungeva da controllo positivo del differenziamento, le cellule delle sette linee staminali tumorali di GBM esprimevano contemporaneamente sia marcatori di staminalità che marcatori di differenziamento in percentuali variabili [Tab.3, Fig.18].

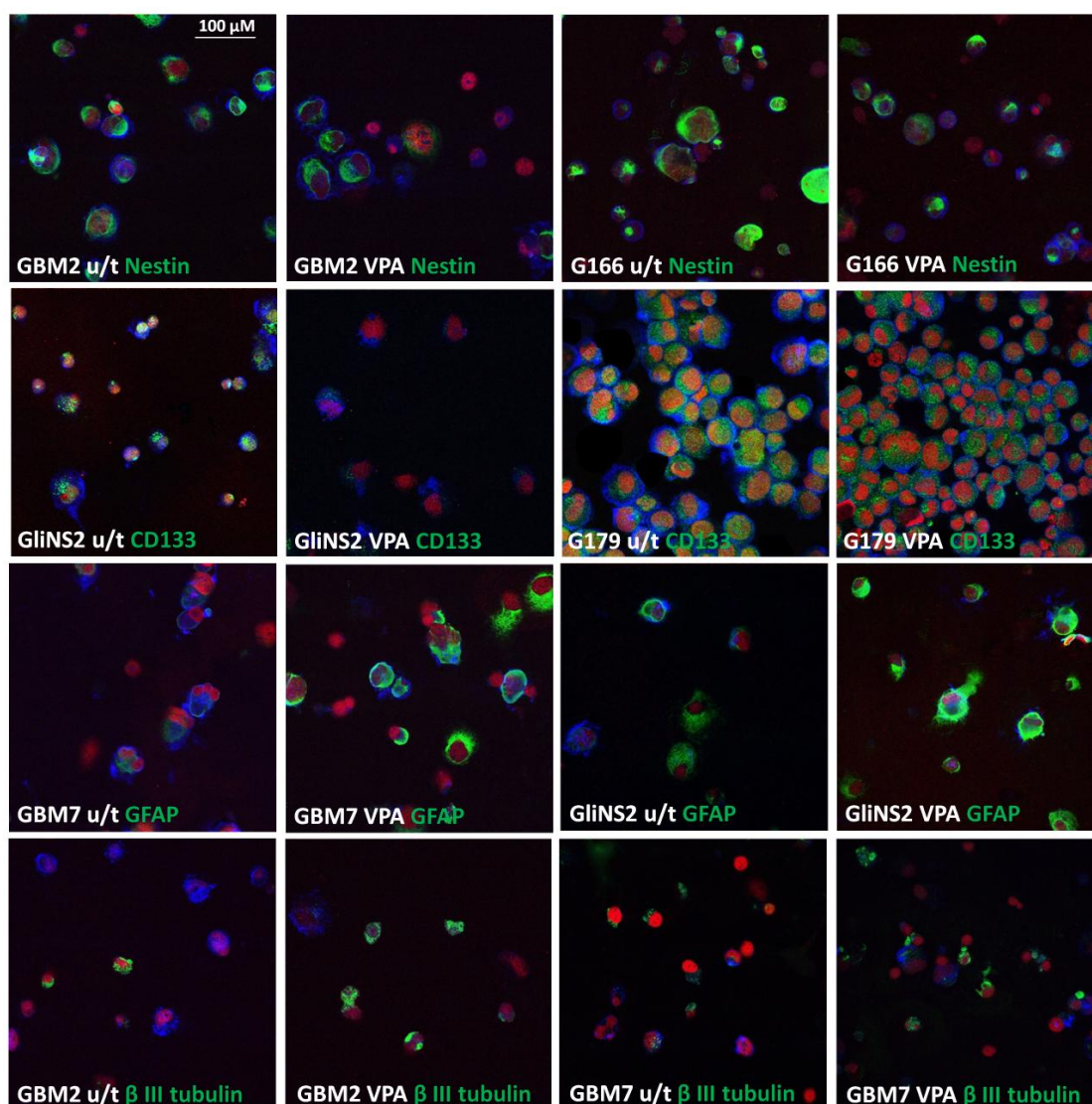


Figura 18. Valutazione dell'espressione di marcatori di staminalità e differenziamento in cellule delle linee di GSCs oggetto di studio, trattate con VPA 2 mM e non. In verde si apprezza il marcatore, in rosso viene evidenziato il nucleo, mentre in blu il citoscheletro. La linea bianca presente nella prima foto rappresenta 100 μM.

Specificatamente in questo lavoro, sono stati eseguiti esperimenti di IF su sei linee di cellule staminali tumorali, di cui cinque trattate con VPA 2 mM (GBM2, GBM04, G144, G179 e GliNS2) e una trattata con VPA 1 mM (G166) per tempi di esposizione pari a 14 e 30 giorni, al fine di verificare se il farmaco fosse in grado di indurre un differenziamento terminale, determinando inoltre la perdita dell'espressione dei marcatori di staminalità tipici di queste linee. Per quanto riguarda la linea GBM7, non è stato possibile ottenere un sufficiente numero di cellule per poter eseguire gli esperimenti, in quanto prevaleva l'effetto citotossico del VPA in trattamenti di lunga durata, anche riducendo la concentrazione farmacologica fino a 0,5 mM, come

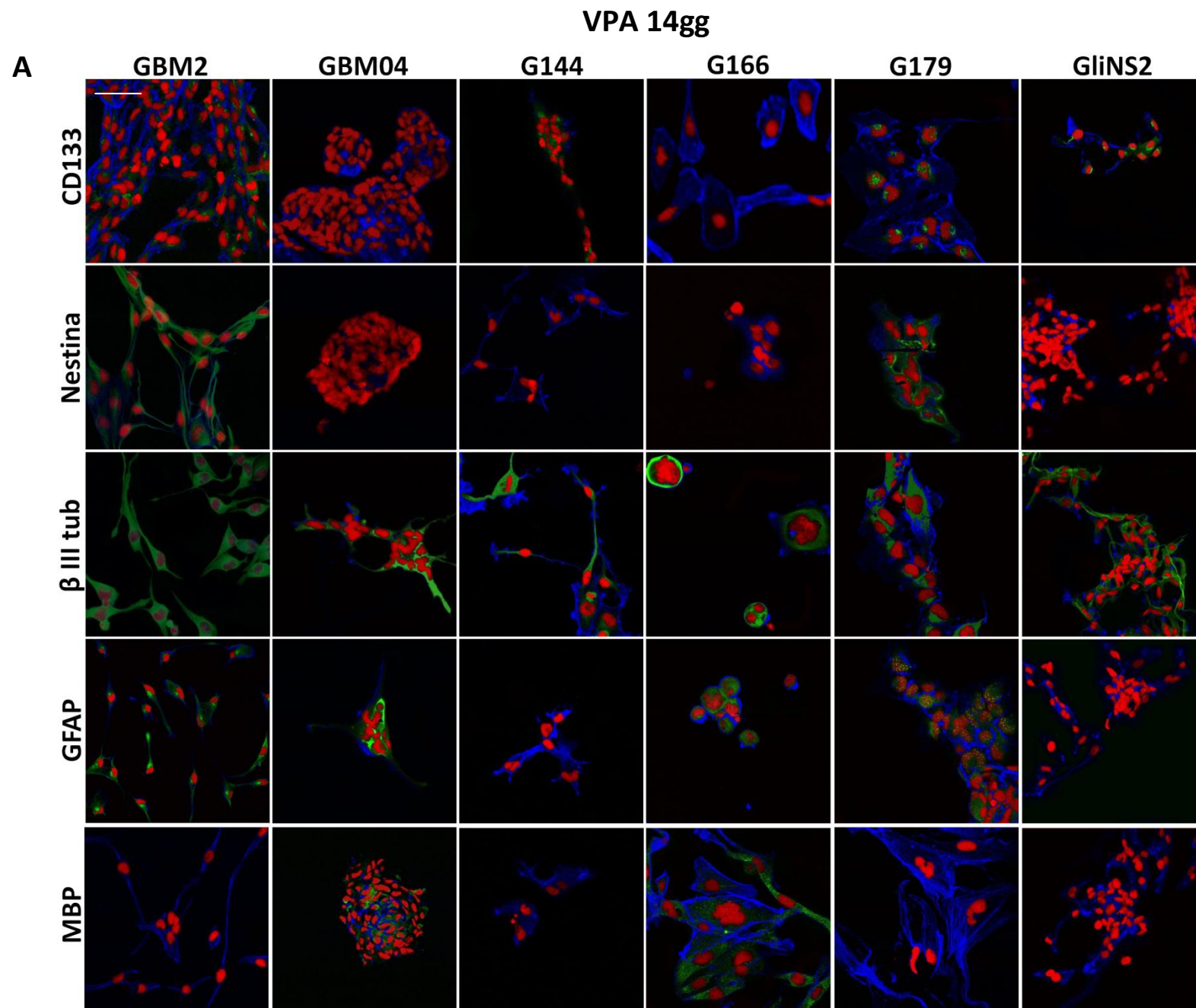
evidenziato dallo studio morfologico. Anche nella linea G166 è stata osservata una prevalenza dell'effetto citotossico alla concentrazione di 2 mM, a 14 e a 30 giorni di trattamento; tuttavia, riducendo la concentrazione di VPA sino a 1 mM, è stato possibile eseguire l'analisi.

Sono stati selezionati due marcatori specifici per il mantenimento della staminalità, la glicoproteina transmembranale CD133 e Nestina, una proteina strutturale dei filamenti intermedi, mentre per evidenziare il differenziamento nei tre diversi *lineages* neurali sono stati utilizzati i marcatori GFAP (*Glial fibrillary acid protein*, tipico marcatore astrocitario), β III tubulina (TUJ1, classico marcatore neuronale) e MBP (*Myelin basic protein*, un marcatore oligodendrocitico). CD133 e MBP sono proteine di membrana, mentre Nestina, GFAP e β III tubulina sono proteine citoplasmatiche. Per evidenziare i nuclei, è stato utilizzato lo ioduro di propidio, un agente intercalante del DNA, mentre la fallodina è stata utilizzata per marcare il citoscheletro. Per ogni vetrino sono state osservate almeno 100 cellule in aree diverse. Per ogni marcatore analizzato, si è calcolata la percentuale di cellule positive rispetto al totale di cellule osservate.

In virtù dei valori ottenuti, sono state costituite cinque categorie, le quali definiscono il livello d'espressione e vengono identificate con un simbolo specifico:

- ✓ I livello: 0-20% (-)
- ✓ II livello: 20-40% (-/+)
- ✓ III livello: 40-60% (+)
- ✓ IV livello: 60-80% (++)
- ✓ V livello: 80-100% (+++)

Di seguito sono riportate alcune immagini significative e una tabella riassuntiva comprendente i risultati degli esperimenti di immunofluorescenza effettuati su tutte le linee[Fig.19-A/B,Tab.3].



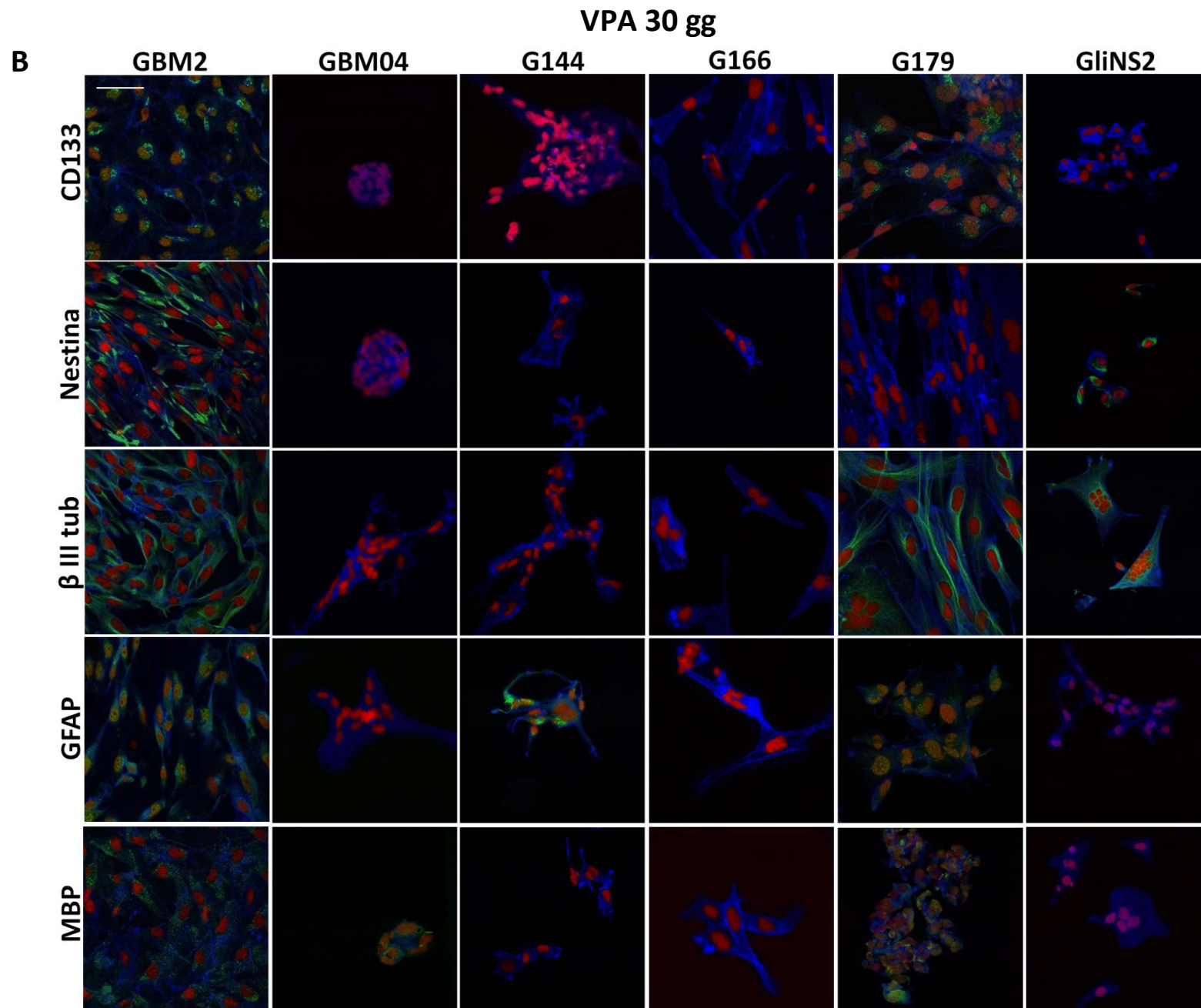


Figura 19. Studio dell'espressione di marcatori di staminalità (CD133 e Nestina) e di differenziamento neurale (β III tubulina, GFAP e MBP) su linee staminali tumorali da GBM dopo trattamento per 14 (A) e 30 (B) giorni con VPA 2 mM (GBM2, GBM04, G144, G179 e GliNS2) o 1 mM (G166). I nuclei sono marcati in rosso con ioduro di propidio, i marcatori in verde, il citoscheletro in blu utilizzando la falloidina. Barra bianca = 100 μ M.

Linee cellulari	Trattamento	CD133		Nestina		β III tubulina		GFAP		MBP	
		%	RANGE	%	RANGE	%	RANGE	%	RANGE	%	RANGE
GBM2	Controllo non trattato	62,96	++	75,44	++	19,27	-	63,81	++	100	+++
	VPA 2 mM 72 ore	56,48	+	53,77**	+	36,45*	-/+	64,81	++	94,96*	+++
	VPA 2 mM 14 giorni	43,39*	+	100***	+++	100***	+++	100***	+++	0***	-
	VPA 2 mM 30 giorni	100***	+++	100***	+++	100***	+++	100***	+++	93*	+++
	RPMI 10% FCS 14 giorni	97,09	+++	100	+++	100	+++	8,26	-	100	+++
	RPMI 10% FCS 30 giorni	78,38	++	68,9	++	100	+++	5,93	-	100	+++
GBM7	Controllo non trattato	94,39	+++	63,1	++	18,06	-	42,72	+	97,78	+++
	VPA 2 mM 72 ore	100*	+++	85**	+++	31,43*	-/+	71,79***	++	100	+++
	VPA 0.5 - 1 - 2 mM 14 giorni	N.D.									
	VPA 0.5 - 1 - 2 mM 30 giorni	N.D.									
	RPMI 10% FCS 14 giorni	100	+++	100	+++	100	+++	100	+++	100	+++
	RPMI 10% FCS 30 giorni	98,03	+++	100	+++	100	+++	99,02	+++	98,26	+++
GBM04	Controllo non trattato	86,29	+++	96,58	+++	76,78	++	86,08	+++	0	-
	VPA 2 mM 72 ore	100***	+++	97,33	+++	88,28***	+++	44,17***	+	0	-
	VPA 2 mM 14 giorni	11,29***	-	0***	-	54,2***	+	100***	+++	76,03***	++
	VPA 2 mM 30 giorni	0***	-	0***	-	0***	-	0***	-	100***	+++
	RPMI 10% FCS 14 giorni	100	+++	100	+++	100	+++	100	+++	96,36	+++
	RPMI 10% FCS 30 giorni	100	+++	100	+++	100	+++	88,24	+++	100	+++
G144	Controllo non trattato	78,38	++	91,35	+++	45,79	+	82,46	+++	100	+++
	VPA 2 mM 72 ore	67,86	++	87,85	+++	13,79***	-	80,9	+++	96,82	+++
	VPA 2 mM 14 giorni	32***	-/+	0***	-	100***	+++	0***	-	0***	-
	VPA 2 mM 30 giorni	0***	-	0***	-	18***	-	32,71***	-/+	0***	-
	RPMI 10% FCS 14 giorni	100	+++	100	+++	0	-	100	+++	100	+++
	RPMI 10% FCS 30 giorni	100	+++	100	+++	100	+++	100	+++	100	+++
G166	Controllo non trattato	7,34	-	78,3	++	25,92	-/+	83,9	+++	100	+++
	VPA 2 mM 72 ore	1,92	-	53,7**	+	43,52*	+	81,31	+++	100	+++
	VPA 1 mM 14 giorni	0*	-	0***	-	99,21***	+++	100***	+++	100	+++
	VPA 1 mM 30 giorni	0*	-	0***	-	0***	-	0***	-	0***	-
	RPMI 10% FCS 14 giorni	100	+++	54,37	+	100	+++	100	+++	100	+++
	RPMI 10% FCS 30 giorni	98,3	+++	79,17	++	100	+++	100	+++	100	+++
G179	Controllo non trattato	100	+++	99,17	+++	100	+++	98,21	+++	0	-
	VPA 2 mM 72 ore	96,32	+++	100	+++	100	+++	100	+++	0	-
	VPA 2 mM 14 giorni	100	+++	73,56***	++	100	+++	100	+++	0	-
	VPA 2 mM 30 giorni	100	+++	0***	-	100	+++	100	+++	100***	+++
	RPMI 10% FCS 14 giorni	100	+++	96,48	+++	98,2	+++	100	+++	95,28	+++
	RPMI 10% FCS 30 giorni	100	+++	94,07	+++	100	+++	100	+++	100	+++
GLINS2	Controllo non trattato	100	+++	79,63	+++	71,43	++	93,64	+++	100	+++
	VPA 2 mM 72 ore	55,5***	+	88,46	+++	62,96	++	89,32	+++	90,74**	+++
	VPA 2 mM 14 giorni	28,15***	-/+	0***	-	95,93***	+++	0***	-	0***	-
	VPA 2 mM 30 giorni	0***	-	100***	+++	100***	+++	0***	-	0***	-
	RPMI 10% FCS 14 giorni	90,48	+++	100	+++	100	+++	100	+++	100	+++
	RPMI 10% FCS 30 giorni	93,14	+++	97,17	+++	100	+++	100	+++	100	+++

Tabella 3. Espressione di marcatori di staminalità e differenziamento neurale nelle sette linee cellulari di GBM in risposta a trattamenti con VPA con diversi tempi di esposizione e significatività statistica rispetto ai campioni non trattati (* p<0,05; ** p<0,001; p<0,0001). Range: 0-20% → - ; 20-40% → +/- ; 40-60% → + ; 60-80% → ++ ; 80-100% → +++ .

Dopo 14 e 30 giorni di trattamento, il 100% delle cellule della linea GBM2 hanno espresso Nestina, β III tubulin e GFAP. L'espressione del marcatore di staminalità CD133 e del marcatore di differenziamento MBP è aumentata, in modo significativo con l'aumentare della durata del trattamento. In particolare, MBP non è risultato espresso dopo 14 giorni di trattamento, ma la sua espressione ha raggiunto il 100% delle cellule dopo 30 giorni. Confrontando i risultati ottenuti con quelli relativi ai campioni non trattati o trattati con VPA 2 mM per 72 ore, è possibile notare come l'espressione dei marcatori di staminalità sia aumentata dopo 14 giorni (solo Nestina) e, soprattutto, dopo 30 giorni di trattamento (entrambi i marcatori), ma anche quella dei marcatori di differenziamento β III tubulin e GFAP. L'espressione del marcatore MBP, diminuita dopo 14 giorni di trattamento rispetto al controllo e al campione trattato per 72 ore, è risultata nuovamente elevata (+++) dopo 30 giorni [Fig.19, Tab.3].

La linea GBM04 ha mostrato percentuali molto basse (0-20%) di cellule esprimenti i marcatori di staminalità CD133 e Nestina, dopo entrambi i tempi di trattamento prolungato. Tali marcatori erano invece espressi da un'elevata percentuale di cellule (80-100%) nei campioni non trattati e in quelli trattati per 72 ore. Per quanto riguarda i marcatori di differenziamento, l'espressione di β III tubulina e GFAP viene azzerata dopo 30 giorni di trattamento con VPA, rispetto ai campioni non trattati o trattati per 72 ore e 14 giorni, mentre quella di MBP è risultata notevolmente incrementata. L'espressione del solo marcatore MBP, una proteina di membrana tipica degli oligodendrociti, dopo 30 giorni di trattamento con VPA 2 mM, fa presupporre un differenziamento preferenziale della linea GBM04 verso il *lineage* oligodendrocitico [Fig.19, Tab.3].

La linea cellulare G144, dopo 14 giorni di trattamento, ha presentato percentuali molto basse (-) di cellule esprimenti Nestina, GFAP e MBP. Per quanto riguarda Nestina e MBP, questa percentuale si è mantenuta anche dopo 30 giorni di trattamento. La percentuale di cellule esprimenti GFAP, invece, è aumentata dopo il trattamento più lungo, giungendo al 32,71% (+/-). Al contrario, la percentuale di cellule esprimenti CD133, è diminuita nel corso del trattamento dai 14 ai 30 giorni (passa dal secondo livello d'espressione al primo). Il cambiamento più evidente ha interessato l'espressione del marcatore β III tubulina: la percentuale di cellule esprimenti tale marcatore si è ridotta in modo considerevole, passando da 80-100% dopo 14 giorni di trattamento, a 0-20% dopo 30 giorni. Dopo 30 giorni di trattamento, l'unico marcatore espresso in modo evidente è stato GFAP, una proteina citoplasmatica filamentosa tipica degli astrociti, facendo ipotizzare un differenziamento preferenzialmente astrocitario di questa linea

cellulare. L'esposizione al farmaco per 14 e 30 giorni ha causato una riduzione dell'espressione dei marcatori di staminalità e dei marcatori di differenziamento GFAP e MBP, rispetto ai campioni non trattati o trattati con VPA 2 mM per 72h [Fig.19, Tab.3].

L'80-100% delle cellule della linea G179 ha mantenuto l'espressione del marcatore di staminalità CD133 e dei marcatori di differenziamento β III tubulina e GFAP in maniera costante nei campioni non trattati o trattati con VPA 2 mM per 72 ore, 14 e 30 giorni. La Nestina è espressa da un'alta percentuale di cellule non trattate e trattate per 72 ore e 14 giorni, mentre non è espressa dalle cellule trattate per 30 giorni. La percentuale di cellule esprimenti MBP, invece, è aumentata considerevolmente, passando dallo 0% del non trattato e dei trattamenti più brevi al 100% nel trattamento per 30 giorni [Fig.19, Tab.3].

Nella linea GliNS2, la percentuale di cellule esprimenti i due marcatori di staminalità ha mostrato un andamento opposto, confrontando i due tempi di trattamento. Nel corso del trattamento, la percentuale di cellule esprimenti CD133 è diminuita (da 20-40% a 0-20%), mentre l'espressione del marcatore Nestina è aumentata in modo considerevole, passando da 0-20% a 80-100%. Tra i marcatori di differenziamento, l'unico espresso in modo elevato (80-100%) dopo entrambi i tempi di trattamento prolungato è stata la β III tubulina, suggerendo l'induzione di un differenziamento preferenziale verso il *lineage* neuronale. Gli altri marcatori non sono risultati espressi (0%, -). Confrontando i dati ottenuti con quelli relativi al campione non trattato e al campione trattato per 72 ore, si riscontra una riduzione significativa dell'espressione dei marcatori CD133, GFAP e MBP, dopo l'esposizione prolungata al farmaco. Al contrario, la percentuale di cellule esprimenti β III tubulina è aumentata dopo i trattamenti più lunghi rispetto agli altri campioni [Fig.19, Tab.3].

Le cellule della linea G166 sono state trattate per 14 e 30 giorni con VPA alla concentrazione di 1 mM, poiché una concentrazione pari a 2 mM si era rivelata tossica: infatti, dopo i due tempi di trattamento testati, erano visibili in coltura numerose cellule morte e detriti, ma soprattutto non vi erano sufficienti cellule integre per eseguire l'analisi. Dopo 14 giorni di trattamento con VPA 1 mM, la linea G166 ha mostrato percentuali molto alte di cellule esprimenti i tre marcatori di differenziamento. Dopo 30 giorni di trattamento, tale percentuale, è diminuita sensibilmente (0% per tutti e tre i marcatori). La percentuale di cellule della linea G166 esprimenti i marcatori di staminalità si è rivelata ugualmente bassa (0-20%) dopo i due tempi di trattamento. I dati ottenuti rivelano, inoltre, che l'espressione di Nestina e di tutti i marcatori di

differenziamento risulta diminuita (0-20%) dopo 30 giorni di trattamento, rispetto ai campioni non trattati e trattati con VPA 2 mM per 72h [Fig.19, Tab.3].

5. Analisi degli effetti di VPA e RSV sulla motilità cellulare

Al fine di valutare gli effetti di VPA e RSV sulla capacità migratoria delle linee di GSCs di questo studio, è stato eseguito il saggio *wound healing assay* (o *scratch assay*) su 6 linee cellulari staminali da GBM (GBM2, GBM7, GBM04, G144, G179 e GliNS2). Questo saggio di migrazione non è stato eseguito sulla linea cellulare G166, poiché, nonostante i lunghi tempi di coltura e i molteplici tentativi effettuati, non è stato possibile ottenere il *monolayer* cellulare necessario per eseguire il test. Per ciascuno dei due farmaci studiati sono state saggiate concentrazioni crescenti per 48, 72 e 96 ore di trattamento. Non sono state svolte valutazioni dopo 24 ore dalla somministrazione del farmaco, in quanto il tempo trascorso era troppo breve per poter osservare modificazioni apprezzabili. In ogni prova è stato incluso un controllo (CTRL) non trattato come riferimento. I dati riportati sono espressi come percentuale di migrazione relativa rispetto a tale CTRL. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software *freeware* "T scratch", il quale ha permesso di calcolare la variazione della superficie occupata dalle cellule nel corso del trattamento farmacologico e di confrontarla con quella del campione non trattato. Infine, è stata effettuata un'analisi statistica sui dati grezzi tramite *t test* [Tab.S2].

Nei trattamenti con concentrazioni crescenti di VPA (1-2-5-10 mM) per 48 ore si è assistito ad una risposta molto variabile da parte delle diverse linee cellulari. La linea GBM7 ha mostrato una diminuzione della capacità migratoria dose-dipendente molto evidente, passando dal 100% al 25% circa di migrazione relativa del trattamento 10 mM ($p < 0,0001$). La linea GliNS2 ha evidenziato una riduzione della migrazione solo alla concentrazione farmacologica maggiore (10 mM), mentre concentrazioni di VPA più basse non hanno avuto alcun effetto sulla motilità cellulare. La linea GBM04 ha mostrato inizialmente un aumento della motilità, fino al 130% alla concentrazione più bassa di farmaco ($p < 0,01$); in seguito, dopo trattamento con VPA 5 mM, tale linea ha fatto registrare una riduzione della migrazione fino al 65% ($p < 0,0001$). Le tre linee cellulari rimanenti (GBM2, G179, G144) hanno manifestato inaspettatamente un aumento della motilità cellulare a tutte le concentrazioni di VPA testate [Fig.20-A; Fig.21-A/B].

In seguito al trattamento per 72 ore con VPA, le linee GBM7 e GliNS2 hanno presentato una significativa riduzione della motilità cellulare, fino al 35% circa del trattamento con VPA 10 mM ($p<0,0001$ e $p<0,01$, rispettivamente); la linea GBM04 ha mostrato un comportamento simile a quello rilevato dopo 48 ore di trattamento, mentre le restanti linee cellulari un leggero aumento della migrazione [Fig.20-B; Fig.21-A/B]. Gli effetti della somministrazione di VPA a concentrazioni crescenti sulla motilità cellulare, dopo 96 ore di trattamento, sono risultati evidenti solo nelle linee GBM7 e, soprattutto, GliNS2, nelle quali la capacità migratoria è diminuita rispettivamente fino al 62% ($p<0,05$) e al 4% ($p<0,01$). Nelle restanti linee cellulari analizzate, il VPA sembra non avere avuto ulteriori effetti sulla migrazione, che è rimasta inalterata a tutte le concentrazioni testate rispetto al trattamento per 72 ore. [Fig.20-C; Fig.21-A/B]

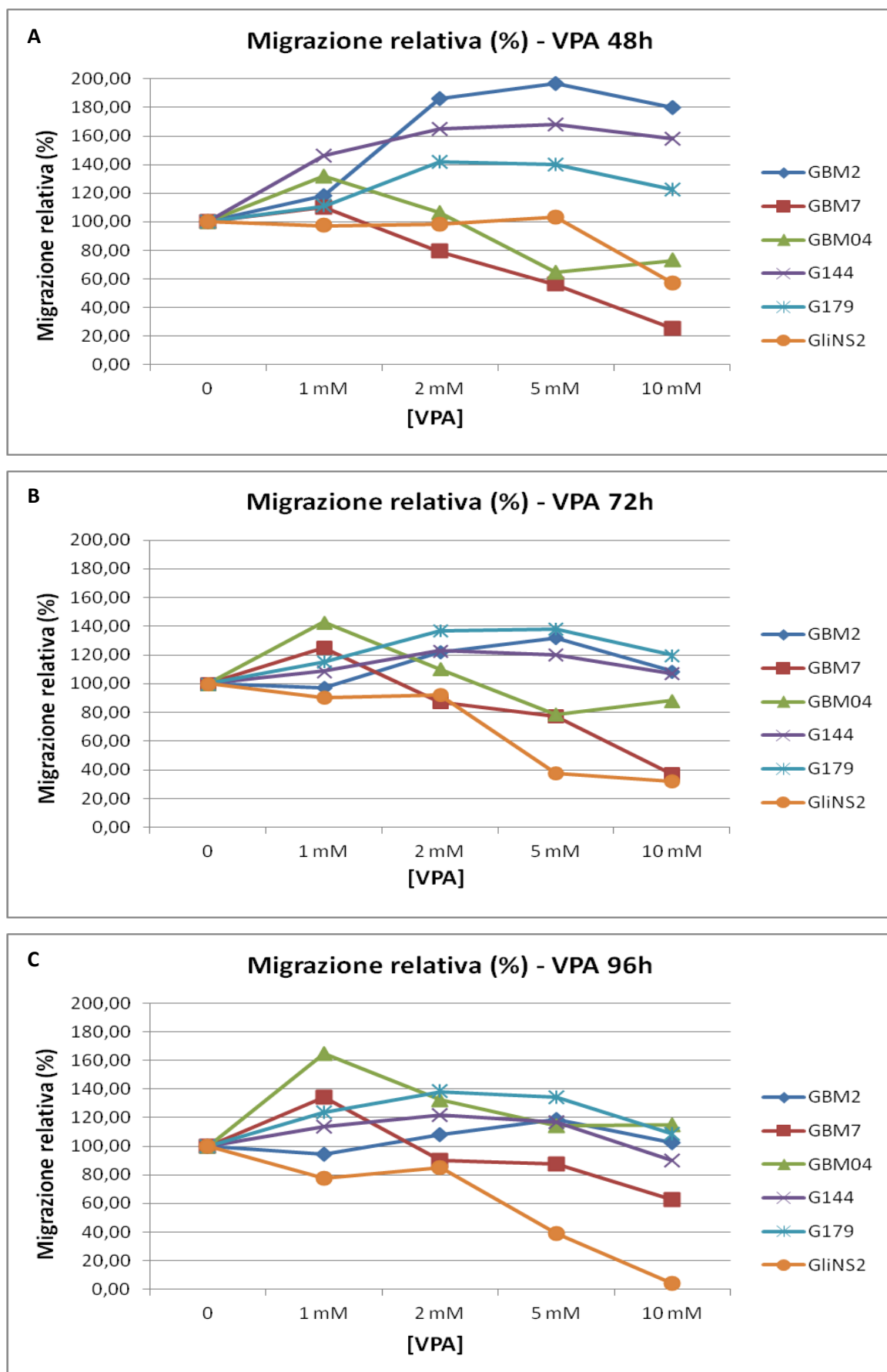


Figura 20. Curve della percentuale di migrazione relativa delle linee di GSCs trattate con concentrazioni crescenti di VPA (1-2-5-10 mM) per 48 (A), 72 (B) e 96 (C) ore.

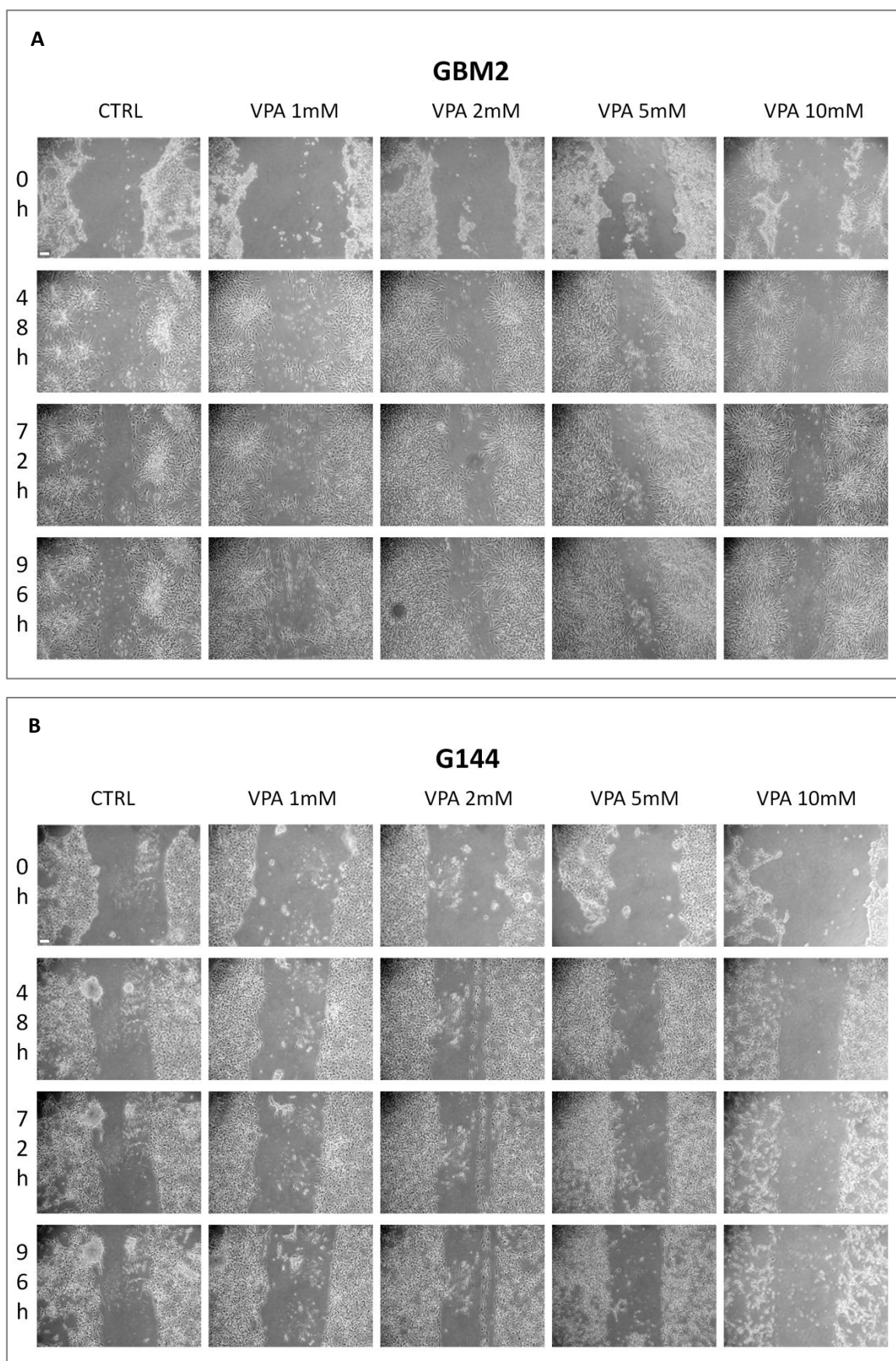


Figura 21. Valutazione delle variazioni della migrazione cellulare, indotte dalla somministrazione di concentrazioni crescenti di VPA, in cellule staminali tumorali di GBM della linea GBM2 (A) e G144 (B), a 48-72-96 ore dall'inoculo del farmaco. La linea bianca, presente nella prima foto di ogni pannello, rappresenta 100 μ m.

Nel trattamento con concentrazioni crescenti di RSV (10-50-100-200 μ M), già dopo 48 ore si è potuta osservare una riduzione della capacità migratoria in tutte le linee cellulari testate. La riduzione della motilità cellulare, fino al 20-30%, è risultata evidente in particolare nelle linee GBM2 ($p<0,0001$), GBM7 ($p<0,01$) e G144 ($p<0,0001$) [Fig. 22-A; Fig.23-A/B].

Dopo 72 ore e, soprattutto, dopo 96 ore di trattamento con RSV, l'inibizione della migrazione cellulare è diventata ancora più evidente, anche alle concentrazioni più basse. Occorre sottolineare, però, che il trattamento per 96 ore con RSV 200 μ M è risultato estremamente tossico per le linee GBM04, GBM7 e GliNS2, provocando un totale distacco del monolayer cellulare e rendendo di fatto impossibile l'esecuzione del test. Per la linea GBM7, tale effetto è stato riscontrato già dopo 72 ore di trattamento con RSV 200 μ M. [Fig.22-B/C; Fig.23-A/B].

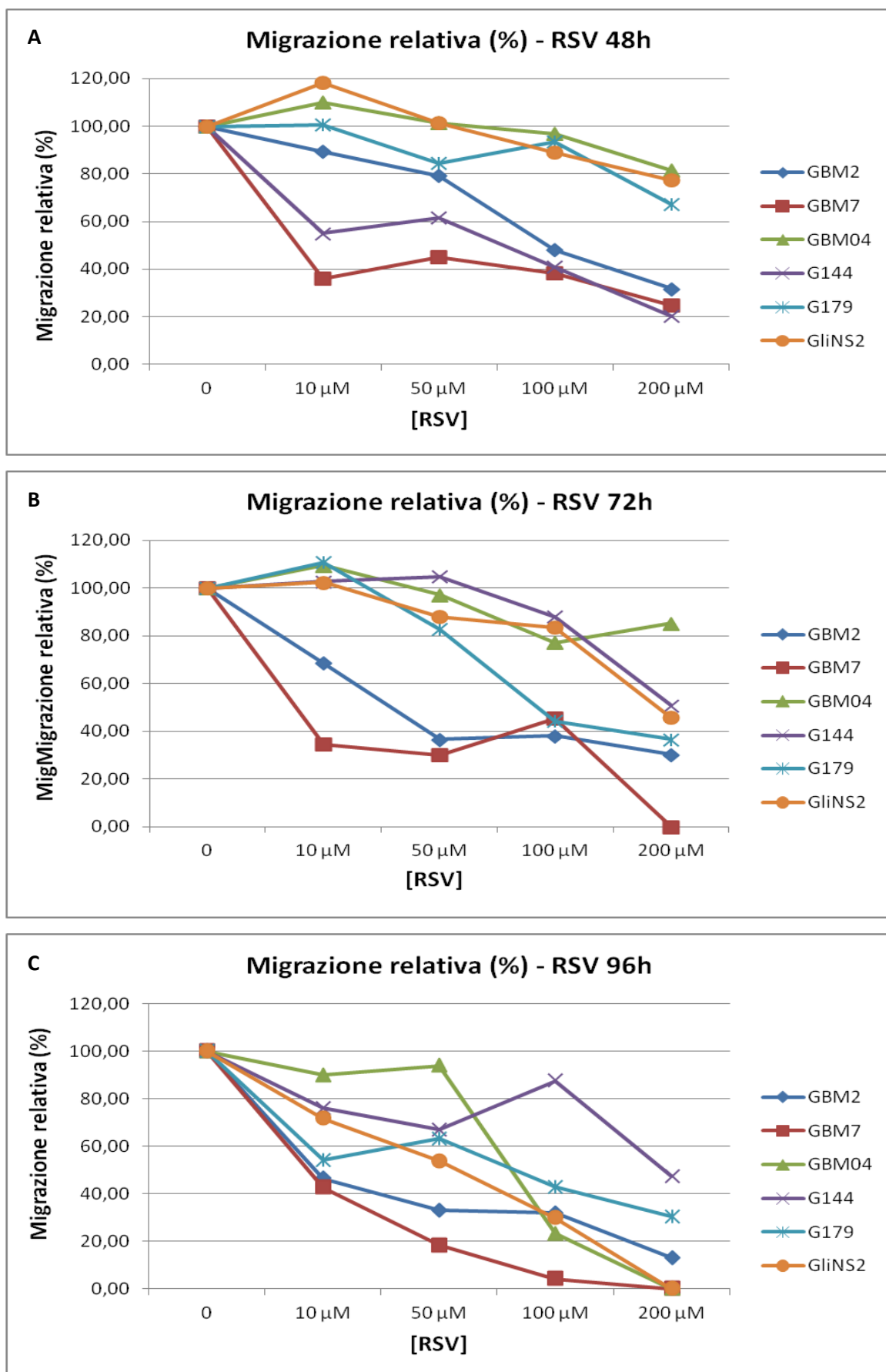
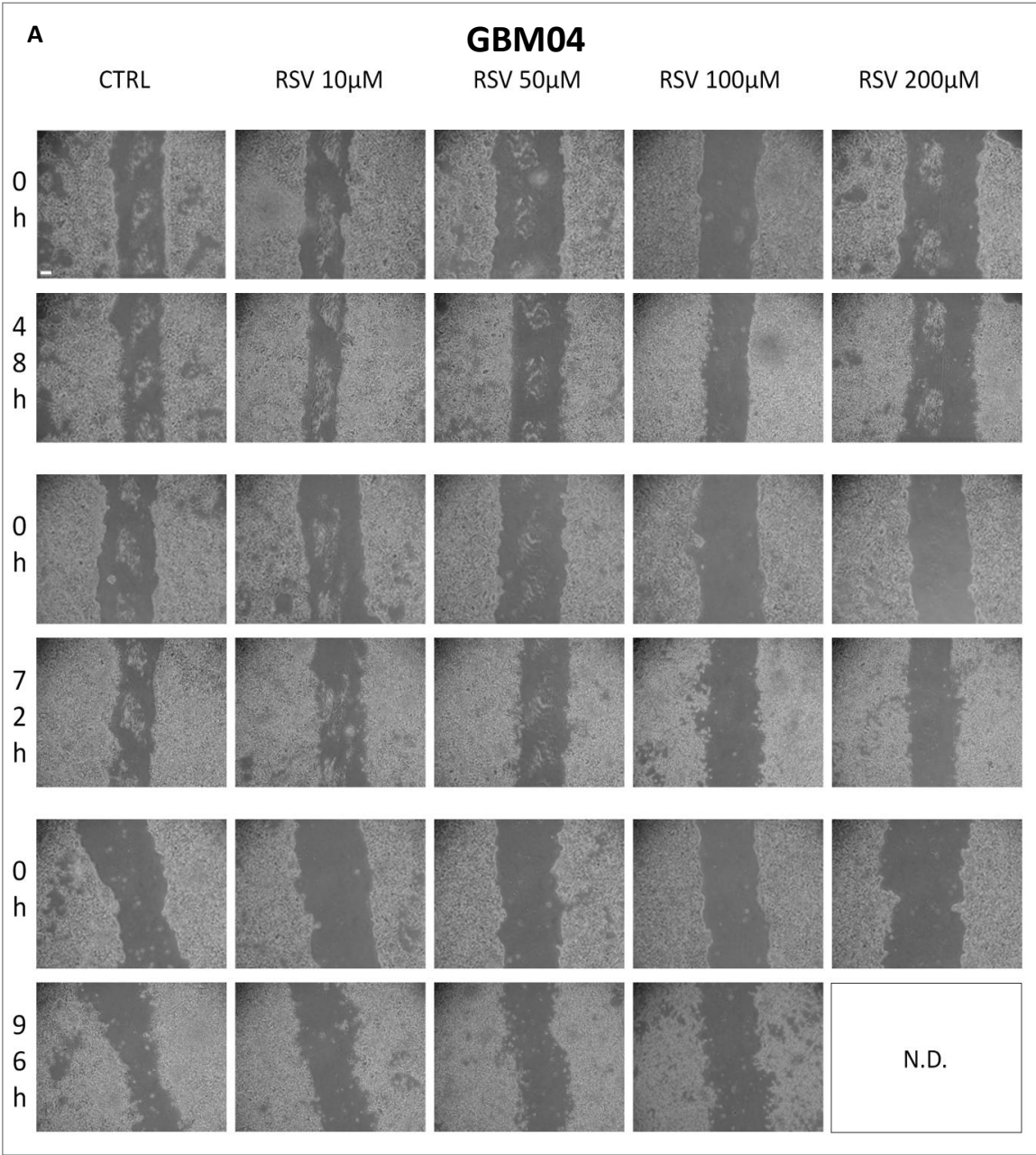


Figura 22. Curve della percentuale di migrazione relativa delle linee di GSCs trattate con concentrazioni crescenti di RSV (10-50-100-200 μ M) per 48 (A), 72 (B) e 96 (C) ore.



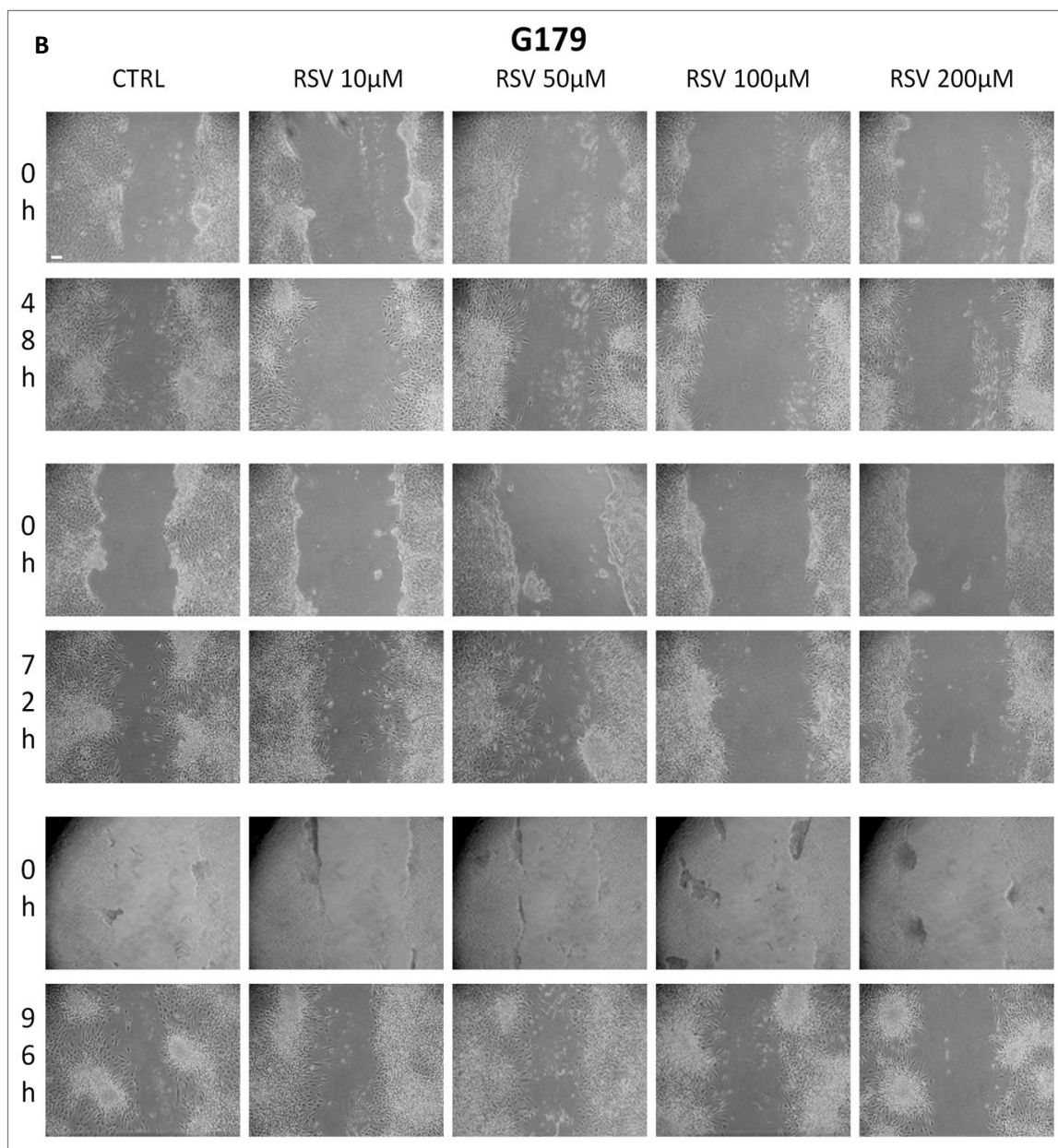


Figura 23. Valutazione delle variazioni della migrazione cellulare, indotte dalla somministrazione di concentrazioni crescenti di RSV, in cellule staminali tumorali di GBM della linea GBM04 (A) e G179 (B), a 48-72-96 ore dall'inoculo del farmaco. La linea bianca, presente nella prima foto di ogni pannello, rappresenta 100 μ m.

6. Analisi degli effetti di VPA e RSV sul *pathway* di WNT

Il *pathway* molecolare di Wnt controlla lo sviluppo di molti organi e tessuti a livello embrionale, mentre nell'adulto mantiene l'omeostasi tissutale, regolando il differenziamento, la polarità cellulare, la migrazione, la sopravvivenza e la morte cellulare. Le alterazioni dei processi di differenziamento e migrazione cellulare esistenti nelle cellule staminali tumorali potrebbero essere dovute a modificazioni genetiche e/o epigenetiche a carico dei geni coinvolti nel *pathway* di Wnt e/o ad una sua aberrante regolazione.

Al fine di verificare se i composti utilizzati in questo studio, in virtù della loro attività modulatoria delle deacetilasi istoniche e del loro ruolo come modificatori epigenetici, fossero in grado di modificare l'espressione di geni coinvolti nel *pathway* di Wnt, è stato eseguito uno studio di espressione. Il VPA e il RSV, infatti, potrebbero indirettamente influire sul grado di metilazione del DNA con conseguenze dirette sull'espressione genica, ristabilendo nella migliore delle ipotesi il corretto funzionamento dei meccanismi coinvolti nel differenziamento e nella migrazione cellulare. Inizialmente, è stato eseguito un array PCR utilizzando RNA proveniente da cellule staminali tumorali delle linee GBM2 e G144 trattate per 96 ore con VPA 2 mM e non trattate. La quantificazione dell'espressione dell'mRNA di interesse, calcolata come $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold-change), ha permesso di evidenziare eventuali variazioni, indotte dal VPA, a carico dei geni coinvolti nel *pathway* di Wnt, canonico e non.

Dopo trattamento farmacologico, nelle cellule della linea GBM2, il 32,1% dei geni coinvolti nel *pathway* di Wnt canonico ha mostrato un aumento d'espressione, mentre il 41,1% una riduzione della medesima; nella linea G144, il 28,6% di tali geni è *over-espresso*, mentre il 53,6% presenta una riduzione dell'espressione in seguito a somministrazione di VPA 2 mM [Tab.4-A/D].

Nelle due linee analizzate il 33,3% dei geni del *pathway* non canonico denominato "*Planar Cell Polarity*" (PCP) è risultato *up-regolato*, mentre il 16,7% è *down-regolato* [Tab.4-B/D]. Infine, per quanto riguarda i geni coinvolti nel *pathway* non canonico Wnt/ Ca^{2+} , il 64,7% e il 47% è *over-espresso* nelle linee GBM e G144, rispettivamente, mentre il 17,7%, nella linea GBM2, e il 41,2%, nella linea G144, ha mostrato una riduzione dell'espressione [Tab.4-C/D].

I dati raccolti, quindi, hanno mostrato che il VPA tende a ridurre l'espressione di geni coinvolti nel *pathway* canonico, mentre i geni dei *pathway* non canonici risultano, in generale, *up-regolati*.

A	Wnt canonical pathway	GBM2		G144	
		Trend	Fold reg	Trend	Fold reg
	AES (TLE/Groucho)	↓	-2,52	↓	-2,50
	APC	↓	-1,71	↓	-1,59
	AXIN1	↓	-2,33	↓	-2,91
	BCL9	↓	-1,80	↓	-2,31
	CSNK1A1	↓	-1,96	↓	-1,85
	CSNK1D	↓	-1,72	↓	-2,23
	CSNK1G1	=	-1,21	=	-1,34
	CSNK2A1	=	-1,36	↓	-1,72
	CTBP1	↓	-1,98	↓	-2,25
	CTBP2	↓	-1,47	↓	-1,71
	CTNNB1	↓	-1,66	↓	-1,71
	CTNNBIP1 (ICAT)	↓	-2,27	↓	-3,05
	CXXC4	↑	44,44	↑	2,14
	DIXDC1	=	1,07	=	-1,03
	DKK1	↑	5,95	↑	5,72
	DVL1	=	1,13	=	-1,40
	DVL2	↓	-1,95	↓	-1,74
	EP300	↓	-1,76	↓	-1,93
	FRAT1	↓	-1,89	=	-1,33
	FZD1	=	1,39	↓	-1,56
	FZD2	=	-1,40	↓	-1,55
	FZD3	↓	-1,81	=	-1,12
	FZD4	↑	1,72	↑	1,80
	FZD5	=	-1,31	=	1,35
	FZD6	↓	-1,53	↓	-1,89
	FZD7	=	-1,07	↑	1,64
	FZD8	↑	2,66	=	-1,17
	GSK3A	↓	-2,12	↓	-2,31
	GSK3B	↑	1,55	↓	-1,47
	LEF1	=	-1,39	↓	-1,60
	LRP5	↓	-2,52	↓	-1,46
	LRP6	↓	-1,69	↓	-1,92
	NKD1	=	1,11	↑	3,54
	PORCN	=	-1,27	=	-1,21
	PPP2CA	=	1,15	↓	-1,51
	PPP2R1A	↓	-1,87	↓	-1,67
	PYGO1	↓	-1,65	↓	-2,18
	SEN2	=	-1,40	↓	-1,91
	SFRP1	↑	90,70	↑	1,71
	SFRP4	↑	3,41	↑	2,74
	SOX17	=	1,22	=	1,10
	TCF7	=	1,32	↑	2,34
	TCF7L1	↓	-1,88	↓	-2,13
	WIF1	↑	15,67	↑	5,72
	WNT1	↑	50,24	↑	21,76
	WNT10A	↑	1,87	↑	7,44
	WNT16	↑	2,03	↑	4,32
	WNT2	↑	12,18	↑	6,77
	WNT2B	↓	-1,81	↓	-1,92
	WNT3	↓	-4,23	↓	-3,39
	WNT3A	↑	1,68	↑	1,67
	WNT4	↑	5,58	↓	-1,57
	WNT6	↑	7,95	↑	19,92
	WNT7A	↑	6,72	↑	6,65
	WNT7B	↑	2,14	↓	-10,26
	WNT8A	↑	2,59	=	1,13

B	Planar cell polarity	GBM2		G144	
		Trend	Fold reg	Trend	Fold reg
	DAAM1	=	1,12	=	1,12
	DVL1	=	1,13	=	-1,40
	DVL2	↓	-1,95	↓	-1,74
	NKD1	=	1,11	↑	3,54
	RHOU	↑	2,02	=	-1,29
	WNT9A	↑	1,81	↑	1,90

C	Wnt/Ca2+	GBM2		G144	
		Trend	Fold reg	Trend	Fold reg
	FZD2	=	-1,40	↓	-1,55
	WNT1	↑	50,24	↑	21,76
	WNT10A	↑	1,87	↑	7,44
	WNT11	↓	-3,72	↑	3,20
	WNT16	↑	2,03	↑	4,32
	WNT2	↑	12,18	↑	6,77
	WNT2B	↓	-1,81	↓	-1,92
	WNT3	↓	-4,23	↓	-3,39
	WNT3A	↑	1,68	↑	1,67
	WNT4	↑	5,58	↓	-1,57
	WNT5A	=	1,12	↓	-2,34
	WNT5B	=	1,10	↓	-1,96
	WNT6	↑	7,95	↑	19,92
	WNT7A	↑	6,72	↑	6,65
	WNT7B	↑	2,14	↓	-10,26
	WNT8A	↑	2,59	=	1,13
	WNT9A	↑	1,81	=	1,90

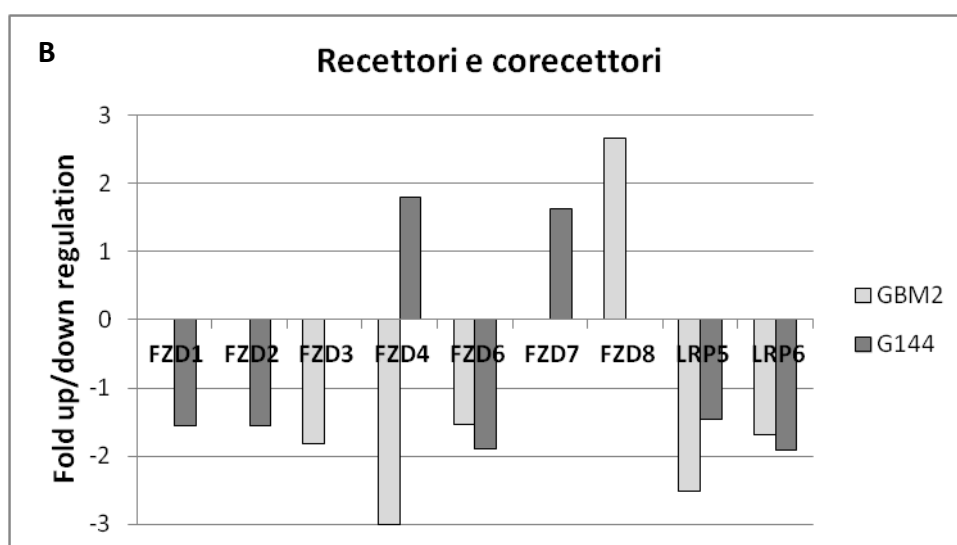
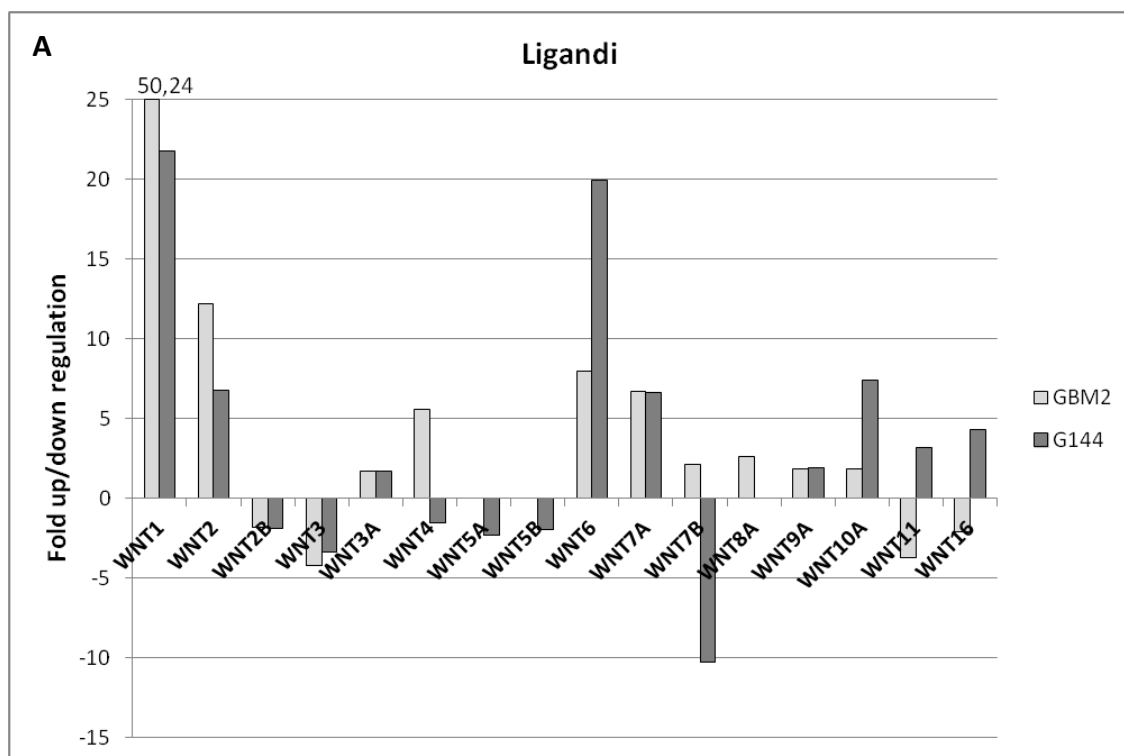
D	Variazione dell'espressione genica (%) dopo somministrazione di VPA			
	GBM2	↑	↓	=
	Canonical pathway	32,1%	41,1%	26,8%
	Planar cell polarity	33,3%	16,7%	50%
	Wnt/Ca2+	64,7%	17,7%	17,7%
	G144	↑	↓	=
	Canonical pathway	28,6%	53,6%	17,5%
	Planar cell polarity	33,3%	16,7%	50%
	Wnt/Ca2+	47,0%	41,2%	11,8%

Tabella 4. Fold regulation e interpretazione biologica delle variazioni d'espressione dei geni del *pathway* canonico di WNT (A) e di quelli non canonici (B,C) dopo somministrazione di VPA 2 mM per 96 ore. “↑” indica un’*up*-regolazione per fold reg ≥ +1,5; “↓” indica una *down*-regolazione per fold reg ≤ -1,5; “=” indica che l’espressione è invariata e si assegni per

-1,5 < fold reg < +1,5. In **D**, variazione in percentuale dell'espressione dei geni del *pathway* di Wnt appartenenti alla via canonica e non dopo somministrazione di VPA 2 mM per 96 ore.

Suddividendo i geni analizzati in categorie determinate dalla funzione di ognuno di essi, è possibile sottolineare alcune variazioni importanti nell'espressione di ligandi, recettori, inibitori del *pathway* di Wnt, proteine in grado di legarsi a β -catenina

(*CTNNB1*) in sede di trascrizione e geni target. I ligandi sono quelli che mostrano una maggiore variabilità dei livelli di espressione dopo trattamento farmacologico; alcuni ligandi risultano *up-regolati* o *down-regolati* in maniera concorde nelle due linee cellulari considerate (*WNT1*, *WNT2*, *WNT2B*, *WNT3*, *WNT3A*, *WNT6*, *WNT7A*, *WNT9A*, *WNT10A*); altri, invece, mostrano risultati opposti (*WNT4*, *WNT5A*, *WNT5B*, *WNT7B*, *WNT8A*, *WNT11*, *WNT16*) [Fig.24-A]. La maggior parte dei recettori e degli inibitori del *pathway* di Wnt sono *down-regolati*. In particolare è interessante notare come sia LRP5 che LRP6, due corecettori necessari per l'attivazione del *pathway* di Wnt canonico, abbiano presentato una riduzione dell'espressione in entrambe le linee. Gli inibitori *CXXC4*, *SFRP1*, *SFRP4*, *WIF1* e *DKK1*, invece, sono *up-regolati* dopo il trattamento, soprattutto nella linea GBM2 [Fig.24-B/C]. Dagli istogrammi riportati, infine, si può osservare come il trattamento con VPA abbia causato, in entrambe le linee cellulari prese in considerazione, una riduzione dell'espressione di β -catenina (fold regulation: GBM2 = -1,66; G144 = -1,71) e della maggior parte dei fattori in grado di associarsi ad essa al momento della trascrizione; solo *FOXP1* e *TCF7* sono risultati *up-regolati* dopo trattamento nelle cellule della linea G144 [Fig.24-D]. Tra i geni che hanno mostrato una riduzione dell'espressione dopo trattamento con VPA ci sono quelli codificanti per alcune proteine generalmente *up-regolate* nei tumori. *PYGO1*, che insieme a *PYGO2* favorisce l'accumulo di β -catenina nel nucleo e la trascrizione TCF-mediata, ha mostrato una *down-regolazione* pari a -1,65 nella linea GBM2 e -2,18 nella linea G144; anche *BCL9*, che codifica per una proteina adattatrice in grado di facilitare il legame tra *PYGO1/2* e β -catenina e di promuovere l'attività trascrizionale di quest'ultima, e *TCF7L1*, che codifica per un fattore trascrizionale avente come geni target *OCT4* e *NANOG*, hanno presentato una riduzione dell'espressione nelle due linee in seguito a trattamento con VPA. Sono risultati, tuttavia, *down-regolati* anche geni codificanti per proteine in grado di regolare negativamente il *pathway* di Wnt o indurre l'espressione di geni target importanti per il differenziamento cellulare. Si tratta, in particolare, di *EP300*, *CTBP1*, *CTBP2*, *CTNNBIP1*, *AES* e *TLE2* (solo nella linea GBM2) [Fig.24-D]. Per quanto riguarda i geni a valle del *pathway*, l'unico punto in comune tra le due linee è la *down-regolazione* di *BTCL*. Nella linea GBM2 risultano *up-regolati* dopo trattamento i geni *CCND2*, *FOSL1* e *MYC*, mentre è *down-regolato* il gene *WISP2*, oltre al già menzionato *BTCL*. Nella linea G144 si ha invece una generale *down-regolazione* dei geni target di β catenina (*BTCL*, *CCND3*, *FOSL1* e *MYC*) [Fig.24-E].



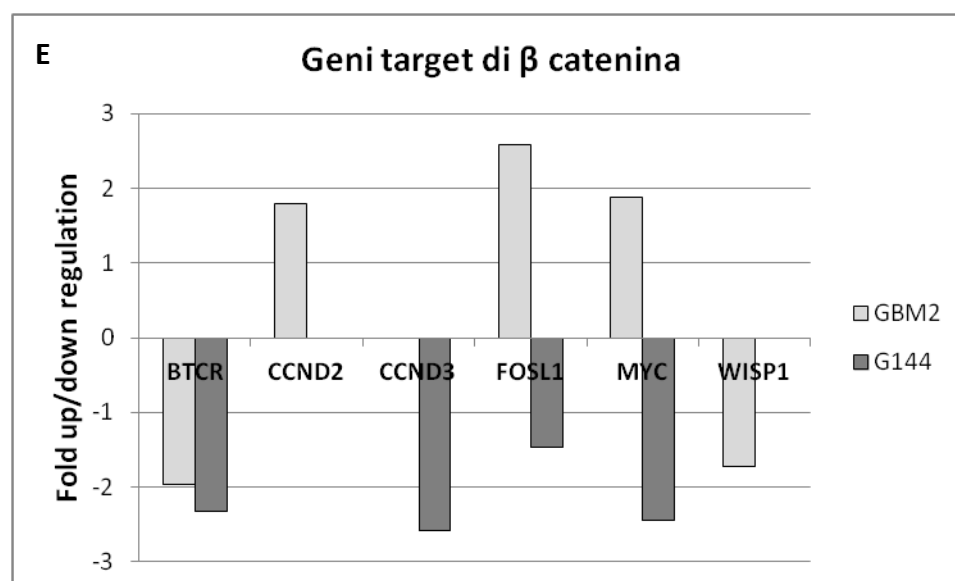
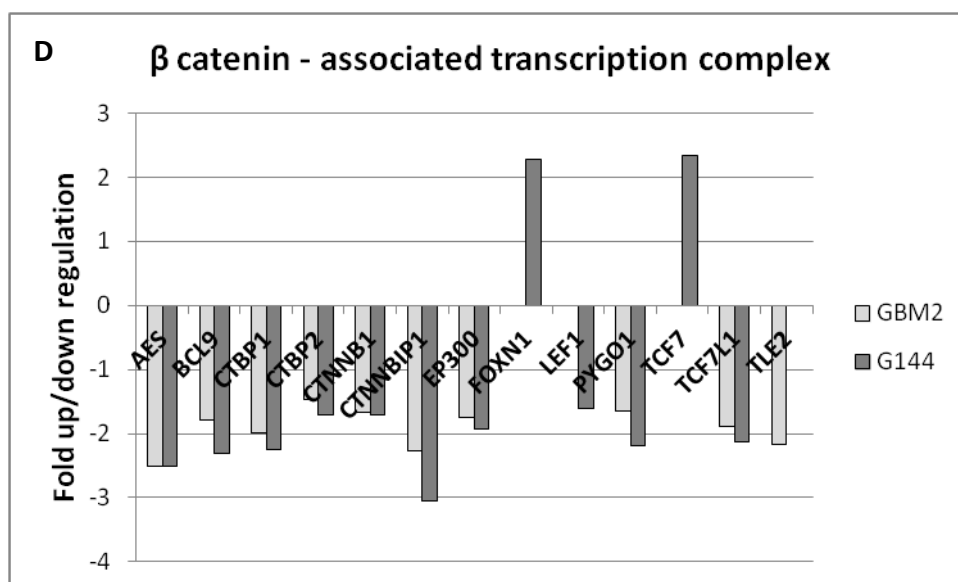
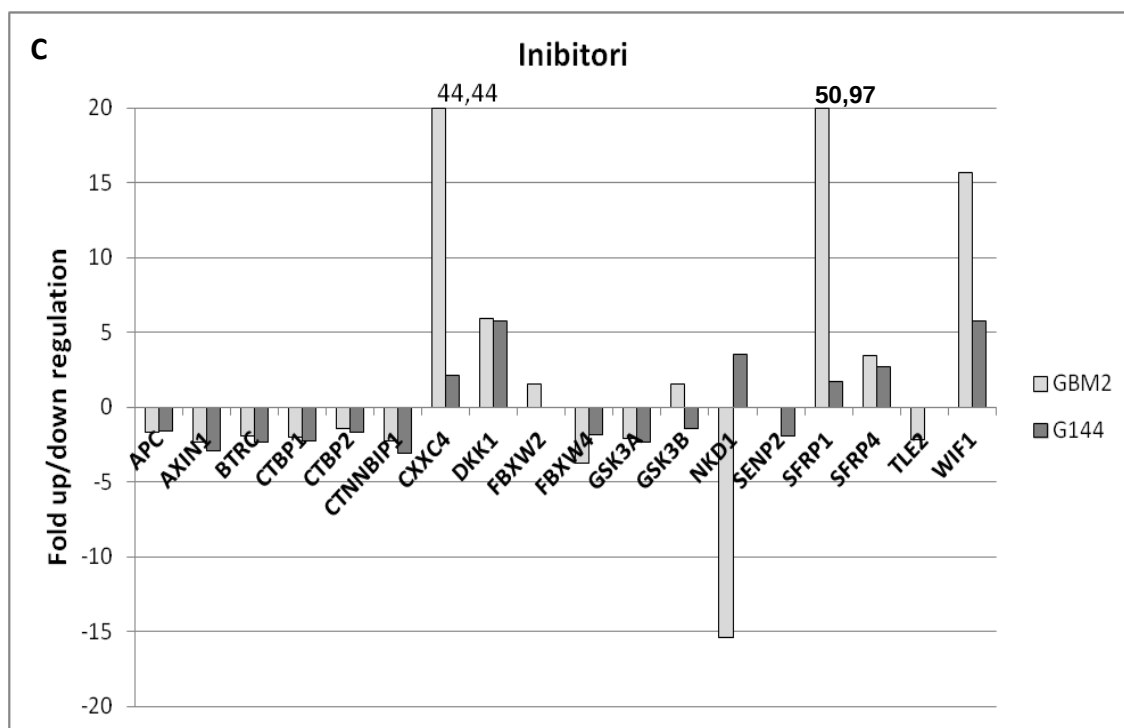


Figura 24. Istogrammi raffiguranti le variazioni di espressione (cut off: fold regulation $\geq +1,5$ o $\leq -1,5$) dei geni codificanti per ligandi (A), recettori (B), inibitori (C) del *pathway* di Wnt, fattori di trascrizione capaci di legarsi a CTNNB1 (D) e geni target di β catenina (E) nelle linee GBM2 e G144 in seguito a trattamento con VPA 2 mM per 96h.

Al fine di approfondire i dati derivanti dall'analisi di espressione eseguita sulle linee GBM2 e G144, è stato eseguito un *immunoblot* per la proteina β catenina su estratti proteici citoplasmatici e nucleari trattati con VPA 2 mM per 96 ore e non trattati. Tali esperimenti hanno evidenziato una diminuzione a livello nucleare della quantità di β catenina pari al 30% nella linea GBM2 e al 33% nella linea G144; per quanto riguarda la quantità di β catenina citoplasmatica, essa è risultata aumentata del 24% dopo trattamento con VPA nella linea GBM2 rispetto al campione non trattato, mentre nella linea G144 è stata registrata una diminuzione del 16% [Fig.25-A/B].

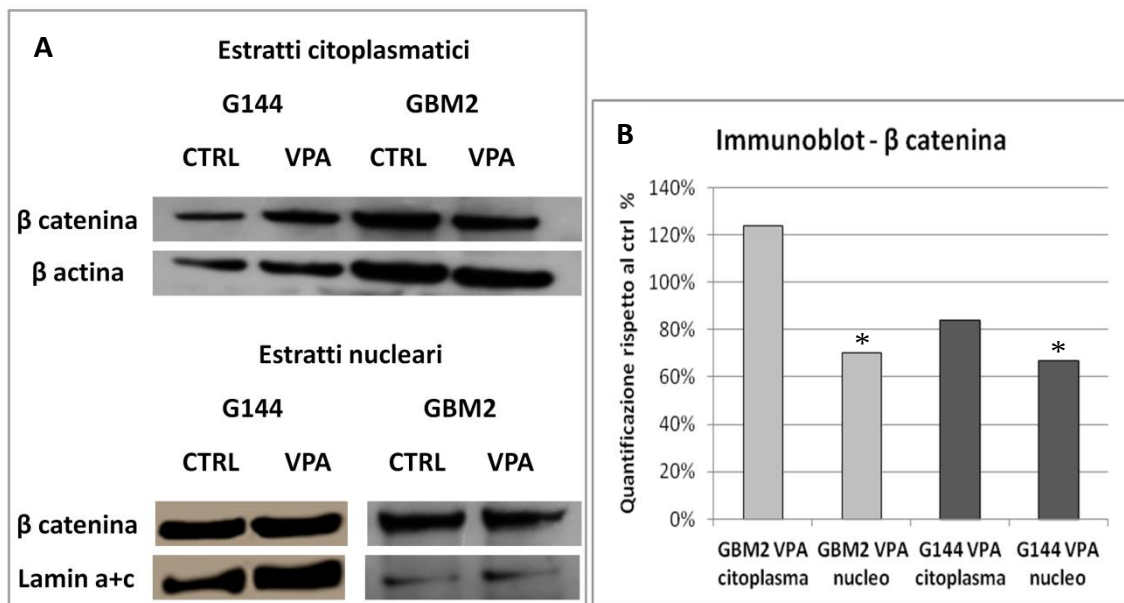


Figura 25. Immunoblot di β catenina eseguito su estratti citoplasmatici (housekeeping β actina) e nucleari (housekeeping lamina a+c) in cellule delle linee G144 e GBM2 trattate con VPA 2 mM per 96 ore e non trattate (A). Quantificazione rispetto al controllo in percentuale (B) (* $p < 0,05$).

Successivamente, l'analisi del pathway di WNT è stato esteso a tutte le linee di questo studio, confrontando campioni di RNA provenienti da cellule non trattate con quelli derivanti da colture trattate con VPA 2 mM per 96 ore o RSV 100 μ M per 96 ore. L'analisi d'espressione non è stata eseguita sull'intero *pool* di geni coinvolti nel *pathway* molecolare di Wnt, ma su 7 geni selezionati (WNT1, FZD4, CTNNB1, EP300, CREBBP, TCF7 e MYC). Nelle tabella 5A e 5B, sono riportati i valori di *fold regulation* di ogni gene e le relative frecce esplicative indicanti l'effetto biologico dei trattamenti in questione, mantenendo il valore $\pm 1,5$ come *cut off* per il *fold regulation*. Il trattamento con VPA ha determinato un aumento dell'espressione del ligando WNT1 (7 linee su 7) e del recettore correlato FZD4 (5 linee su 7). Tale incremento nell'attivazione del recettore da parte del ligando non ha determinato un conseguente

aumento di espressione dei geni testati che si posizionano più a valle nella cascata di trasduzione del segnale di questo *pathway* molecolare. In particolare, il gene CTNNB che codifica per β catenina, il principale effettore del *pathway* di WNT, è risultata *down-regolata* in 4 linee (GBM2, G144, G179 e GliNS2), mentre nelle restanti linee (GBM7, GBM04 e G166) la sua espressione è rimasta invariata. Inoltre, MYC, un importante gene *target* di β catenina che risulta overespresso in molti tipi di tumore, ha mostrato una riduzione dell'espressione in 3 linee su 7 (GBM7, G144 e GliNS2), mentre in altre 3 il livello di espressione è rimasto pressoché invariato. L'espressione di TCF7, un fattore trascrizionale che si lega a β catenina quando quest'ultima migra nel nucleo, non è stata generalmente modificata dal trattamento con VPA, rimanendo sostanzialmente invariata in 5 linee su 7. Infine, i due coattivatori trascrizionali EP300 e CREBBP, i quali si legano alternativamente al complesso β catenina-TCF7 promuovendo la trascrizione poichè dotati di attività acetiltransferasica, sono risultati *down-regolati*, rispettivamente, in 4 linee e 5 linee su 7. E' importante evidenziare che le linee cellulari GBM2, G179 e GliNS2 hanno presentato, dopo trattamento con VPA, livelli di espressione sensibilmente ridotti per entrambi i coattivatori trascrizionali (Tab. 5-A).

Per quanto riguarda il trattamento con RSV 100 μ M per 96 ore, tutte le linee di GSCs, ad eccezione di GBM04 e G144, hanno presentato un aumento della trascrizione di WNT1 dopo esposizione al farmaco, mentre soltanto le cellule delle linee GBM2, GBM04 e G144 hanno mostrato aumentati livelli di espressione del recettore FZD4, la cui trascrizione è rimasta stabile nelle restanti linee. I geni CTNNB1 ed EP300 hanno presentato un'attività trascrizionale immutata dopo trattamento farmacologico con RSV in 5 e 6 linee, rispettivamente. L'effetto del RSV appare più eterogeneo per quanto riguarda i livelli trascrizionali di CREBBP: nella linea G166 tale gene è *up-regolato* dal trattamento, nelle linee GBM04 e GliNS2 è *down-regolato*, mentre nelle restanti 4 linee l'espressione non è variata. Per ciò che concerne il fattore di trascrizione TCF7, la situazione è analoga, in quanto si sono registrati aumentati livelli di espressione in 3 linee, ridotti livelli nella linea G166 e livelli invariati nelle linee GBM04, G179 e GliNS2. Infine, i dati relativi all'oncogene MYC hanno mostrato che in tutte le linee, ad eccezione di G144 e GliNS2, vi è un'aumentata attività trascrizionale di questo gene dopo esposizione al RSV (Tab.5-B).

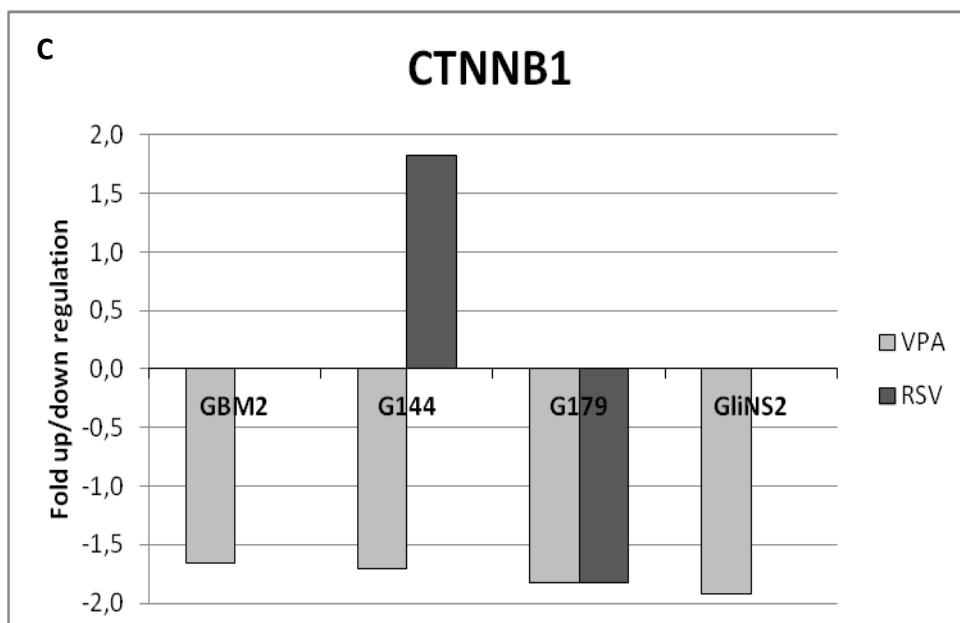
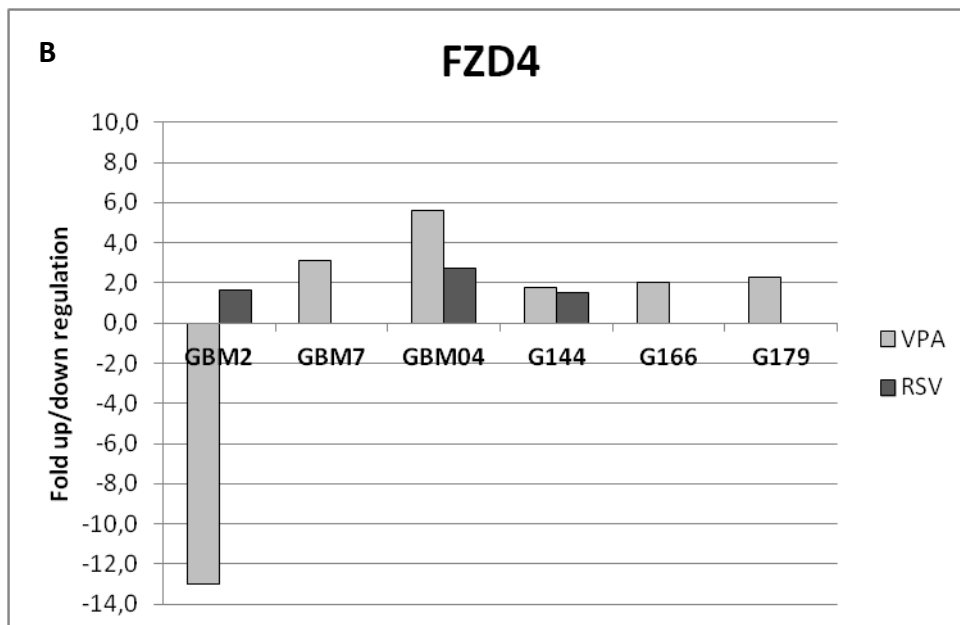
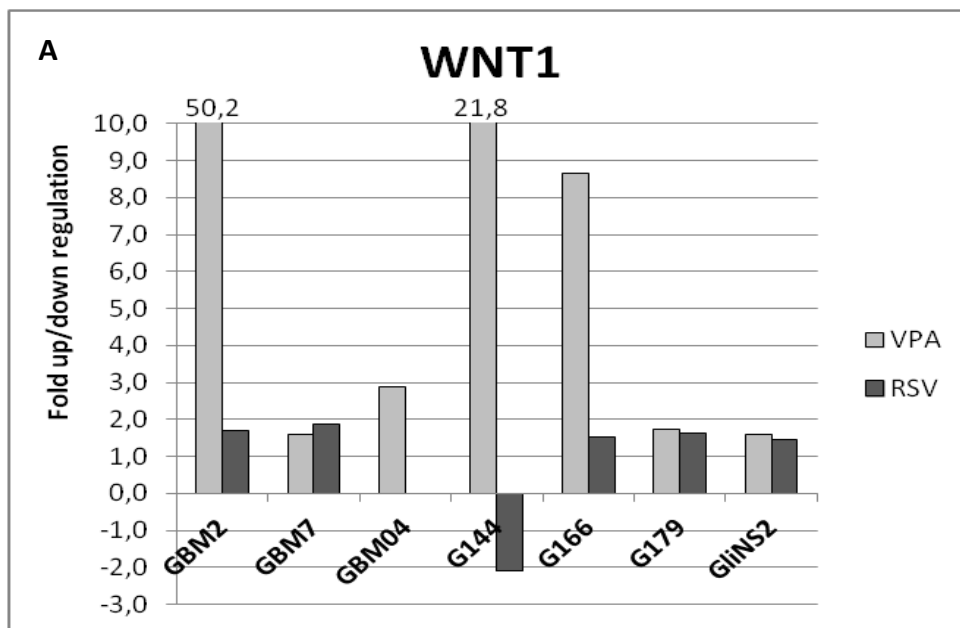
Mantenendo ancora il medesimo valore di *cut off* per il *fold regulation* ($\pm 1,5$), i dati sono stati successivamente valutati, al fine di confrontare gli effetti della

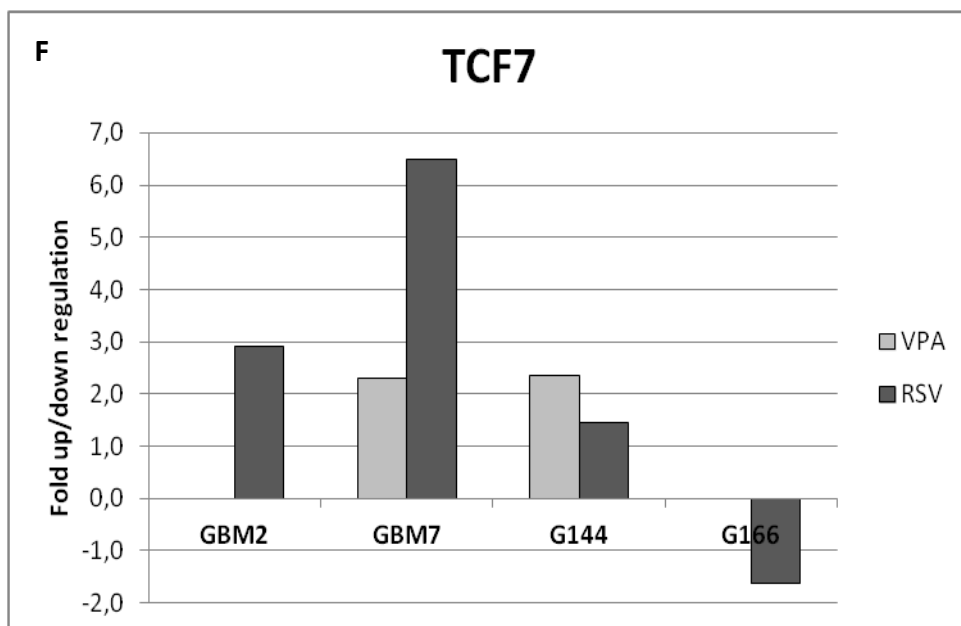
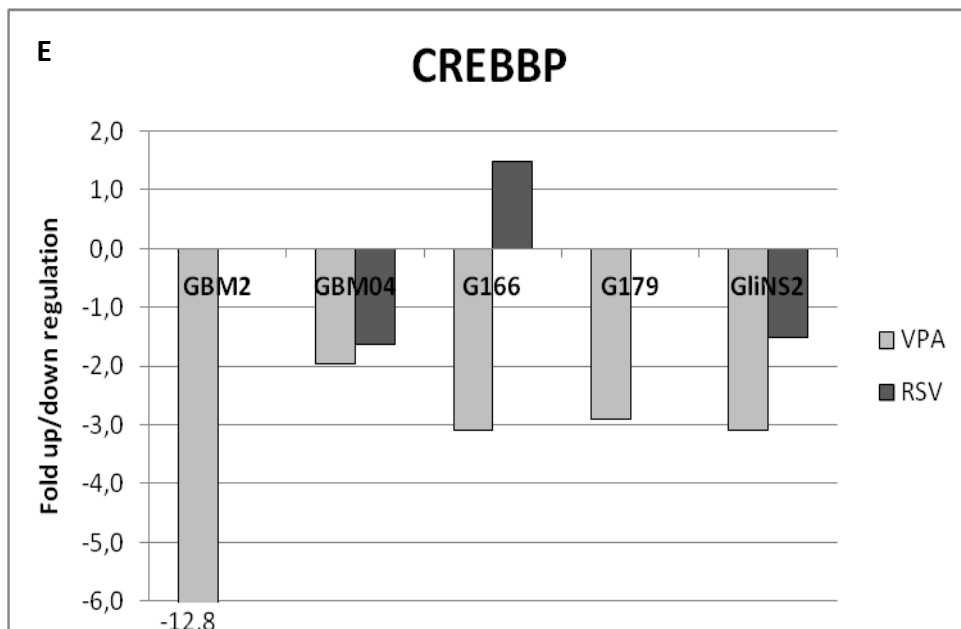
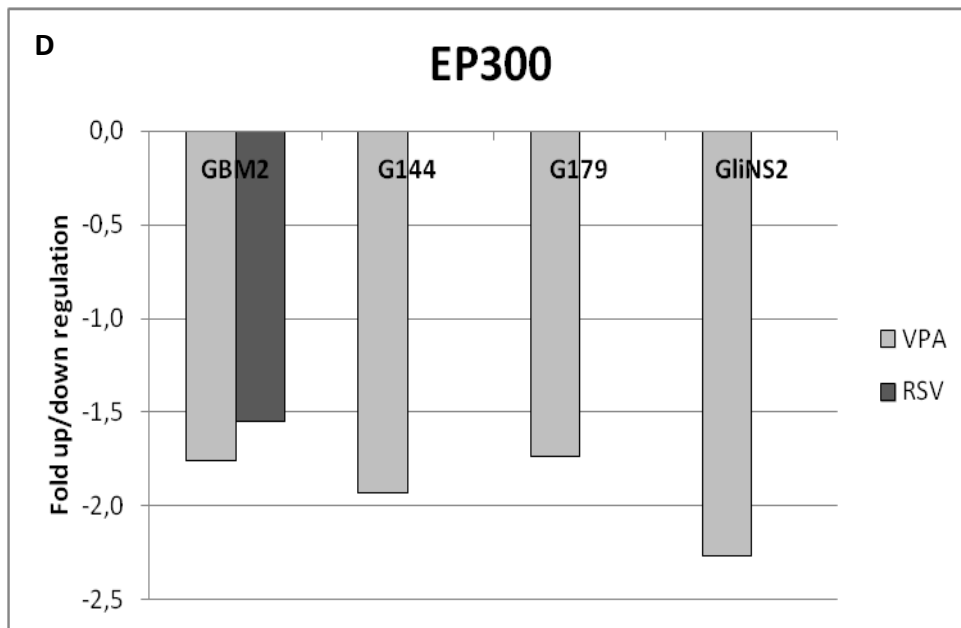
somministrazione di VPA e RSV sull'espressione dei geni analizzati. Da questo punto di vista, è possibile osservare che l'espressione del ligando WNT1, il quale viene generalmente *up*-regolato da entrambi i farmaci in 5 linee cellulari su 7, è aumentata maggiormente dopo trattamento con VPA in 4 linee di GSCs [Fig.26-A]. Sempre in questa ottica, il recettore FZD4 è risultato concordemente overespresso dopo ambedue i trattamenti farmacologici soltanto nelle linee GBM04 e G144, mentre nella linea GBM2 l'espressione di tale gene è stata modificata in maniera discorde dai due composti; inoltre, è possibile notare che, nella linea GliNS2, entrambi i trattamenti non hanno influenzato l'espressione del recettore FZD4 [Fig.26-B]. Per quanto riguarda il gene CTNNB1, è stato rilevato che nelle linee GBM7, GBM04 e G166 non vi è alcuna influenza dei trattamenti sulla trascrizione di questo gene. Nella linea G179, VPA e RSV hanno provocato la medesima riduzione di espressione per β catenina (*Fold regulation* -1,8), mentre nella linea G144 le variazioni indotte dai farmaci sono discordi (VPA *down*, RSV *up*) [Fig.26-C]. Osservando i dati relativi al coattivatore trascrizionale EP300, è opportuno menzionare l'assenza di effetti sulla trascrizione per entrambi i farmaci nelle linee GBM7, GBM04 e G166 e una *down*-regolazione concorde, ma più accentuata nelle cellule esposte al VPA, nella linea GBM2 [Fig.26-D]. Per quanto concerne le variazioni d'espressione del gene CREBBP provocate dall'esposizione ai farmaci di questo studio, si noti la *down*-regolazione concorde, ma più accentuata per il VPA, nelle linee GBM04 e GliNS2 e la mancanza di un effetto significativo nelle linee GBM7 e G144; inoltre, la linea G166 ha fatto registrare valori di *fold regulation* discordi nell'attività trascrizionale del gene in questione dopo somministrazione farmacologica (VPA *down*, RSV *up*) [Fig.26-E]. La trascrizione del gene TCF7 ha fatto registrare un aumento in entrambi i trattamenti nelle linee GBM7 (più consistente nel trattamento con RSV) e G144 (più consistente dopo VPA), mentre non si è modificata nelle linee GBM04, G179 e GliNS2 [Fig.26-F]. Infine, il gene MYC è stato *up*-regolato in maniera concorde da entrambi i farmaci nella linea GBM2, anche se il RSV ha determinato un aumento più marcato dell'espressione (*Fold regulation* +23,2); la linea G144 ha mostrato una *down*-regolazione concorde ed eguale. La linea GBM7 ha evidenziato risposte discordi per quanto riguarda l'espressione di MYC dopo esposizione al VPA e al RSV (VPA *down*, RSV *up*) [Fig.26-G].

A	VPA	GBM2		GBM7		GBM04		G144		G166		G179		GliNS2	
		Fold reg	Trend	Fold reg	Trend	Fold reg	Trend	Fold reg	Trend	Fold reg	Trend	Fold reg	Trend	Fold reg	Trend
	WNT1	50,2	↑	1,6	↑	2,9	↑	21,8	↑	8,7	↑	1,7	↑	1,6	↑
	FZD4	-13,0	↓	3,1	↑	5,6	↑	1,8	↑	2,0	↑	2,3	↑	-1,2	=
	CTNNB1	-1,7	↓	-1,1	=	-1,1	=	-1,7	↓	-1,4	=	-1,8	↓	-1,9	↓
	EP300	-1,8	↓	-1,0	=	-1,3	=	-1,9	↓	-1,3	=	-1,7	↓	-2,3	↓
	CREBBP	-12,8	↓	-1,4	=	-2,0	↓	-1,4	=	-3,1	↓	-2,9	↓	-3,1	↓
	TCF7	1,3	=	2,3	↑	-1,2	=	2,3	↑	1,1	=	-1,2	=	1,2	=
	MYC	1,9	↑	-1,5	↓	-1,2	=	-2,4	↓	1,0	=	1,4	=	-1,7	↓

B	RSV	GBM2		GBM7		GBM04		G144		G166		G179		GliNS2	
		Fold reg	Trend	Fold reg	Trend	Fold reg	Trend	Fold reg	Trend	Fold reg	Trend	Fold reg	Trend	Fold reg	Trend
	WNT1	1,7	↑	1,9	↑	1,1	=	-2,1	↓	1,5	↑	1,6	↑	1,5	↑
	FZD4	1,6	↑	1,1	=	2,7	↑	1,5	↑	1,2	=	1,4	=	-1,2	=
	CTNNB1	1,3	=	1,1	=	-1,1	=	1,8	↑	-1,3	=	-1,8	↓	-1,3	=
	EP300	-1,5	↓	1,3	=	-1,1	=	-1,0	=	-1,2	=	-1,0	=	-1,2	=
	CREBBP	-1,4	=	1,1	=	-1,6	↓	1,2	=	1,5	↑	-1,3	=	-1,5	↓
	TCF7	2,9	↑	6,5	↑	1,1	=	1,5	↑	-1,6	↓	-1,1	=	-1,3	=
	MYC	23,2	↑	1,7	↑	7,0	↑	-2,4	↓	2,6	↑	4,6	↑	1,2	=

Tabella 5. Fold regulation (cut off +/- 1,5) e interpretazione biologica delle variazioni d'espressione ("↑" up-regolato; "↓" down-regolato; "=" invariato) dei 7 geni selezionati coinvolti nel *pathway* di WNT dopo somministrazione di VPA 2 mM (A) e RSV 100 µM (B) per 96 ore.





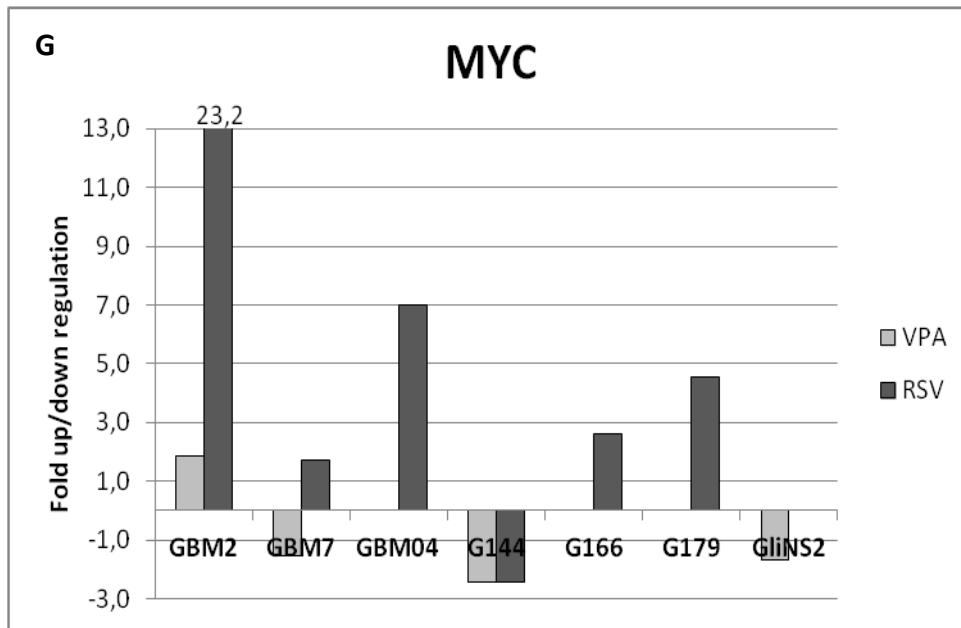


Figura 26. Istogrammi raffiguranti le variazioni di espressione (*cut off: fold regulation $\geq +1,5$ o $\leq -1,5$*) dei geni WNT1 (A), FZD4 (B), CTNNB1 (C), EP300 (D), CREBBP (E), TCF7 (F) e MYC (G) dopo trattamento singolo con VPA 2 mM e RSV 100 μ M per 96 ore in tutte le linee cellulari di questo studio.

Discussione

Il glioblastoma multiforme (GBM) rappresenta la forma più frequente e maligna fra i tumori cerebrali primari. Nonostante i progressi compiuti nella ricerca di base e in ambito terapeutico, il GBM rimane tuttora caratterizzato da prognosi particolarmente infausta: la maggior parte dei pazienti muore dopo soli 12-15 mesi dalla diagnosi e il rischio di recidiva è molto elevato, tant'è che solo il 3% dei pazienti sopravvive a 5 anni dalla diagnosi (Wen and Kesari, 2008). Crescenti evidenze sperimentali hanno dimostrato la presenza, all'interno della massa tumorale, di una popolazione cellulare con caratteristiche staminali, denominata *brain tumor stem cells* (BTSCs), in grado di sostenere la cancerogenesi, propagare il tumore e instaurare meccanismi di resistenza (Ignatova et al., 2002; Singh et al., 2003; Vescovi et al., 2006). Tale sottopopolazione è la principale causa del fallimento delle terapie convenzionali, le quali non sono affatto in grado di colpire la componente staminale del tumore. Di conseguenza, lo sviluppo di terapie mirate alla completa deplezione del pool di BTSCs risulta, quindi, essenziale ai fini di una definitiva eradicazione della neoplasia.

Nel tentativo di approfondire le conoscenze sull'effettivo potenziale di una terapia "*BTSCs-targeted*" nel glioblastoma, in questa tesi sono stati valutati gli effetti antineoplastici di acido valproico (VPA) e resveratrolo (RSV), due farmaci ad azione epigenetica, su sette linee di cellule staminali tumorali da GBM (GBM2, GBM7, GBM04, G144, G166, G179 e GliNS2). L'uso di farmaci ad azione epigenetica potrebbe costituire, infatti, una nuova frontiera per la terapia antineoplastica: le alterazioni epigenetiche, le quali sono coinvolte nella cancerogenesi e nella progressione tumorale, potrebbero rappresentare un *target* ottimale per terapie finalizzate a ripristinare il fisiologico stato epigenetico delle cellule, poiché esse sono reversibili, al contrario delle mutazioni genetiche (Feinberg et al., 2006). L'utilizzo di farmaci che interferiscono con gli enzimi che modificano la cromatina potrebbe, quindi, essere una possibile strategia anche per il trattamento del GBM, per il quale è stata dimostrata la presenza di aberrazioni epigenetiche, analogamente ad altre forme tumorali (Cadieux et al., 2006; Parsons et al., 2008).

Il VPA, già utilizzato in clinica per il trattamento dell'epilessia e dei disturbi bipolari, in virtù del suo effetto anticonvulsivante e sedativo, ha mostrato diversi effetti antineoplastici in una vasta gamma di modelli tumorali, sia *in vitro* che *in vivo*, rivelando un effetto pro-differenziativo, anti-angiogenico e anti-proliferativo (Regan et al., 1985; Cinatl et al., 1997; Gottlicher et al., 2001).

L'analisi dell'attività metabolica effettuata in questa tesi mediante *MTT assay* ha evidenziato, in accordo con i dati riportati in letteratura, una riduzione tempo e dose-dipendente della vitalità cellulare in seguito alla somministrazione di VPA. Tale decremento è risultato particolarmente evidente nelle linee GBM2 e G179, dopo 48 ore e, soprattutto, 72 ore di trattamento. Per quanto riguarda le restanti linee cellulari (GBM7, GBM04, G144, G166 e GliNS2), per osservare una diminuzione apprezzabile dell'attività metabolica, è stata necessaria un'esposizione prolungata alle concentrazioni massime di VPA.

Al fine di verificare l'eventuale effetto antiproliferativo del VPA sulle linee di questo studio, è stata eseguita l'analisi dell'indice mitotico in cellule di sei linee staminali tumorali da GBM (GBM2, GBM7, G144, G166, G179 e GliNS2) derivanti da colture trattate con una dose pari a 2 mM per 48 ore e da colture non trattate. L'esposizione al farmaco ha provocato una notevole diminuzione dell'indice mitotico in tutte le linee, il quale ha fatto registrare in generale un valore più che dimezzato nei confronti dei rispettivi controlli. Non è stata evidenziata una forte correlazione tra l'inibizione dell'attività metabolica e la riduzione dell'indice mitotico in quanto le linee che hanno mostrato una maggior diminuzione di quest'ultimo parametro sono proprio quelle che sembravano maggiormente resistenti in riferimento ai dati derivanti dal *MTT assay*.

L'effetto citotossico/citostatico e l'inibizione della proliferazione derivante dalla somministrazione di VPA possono essere attribuiti alla capacità del farmaco di alterare, mediante l'inibizione dell'attività catalitica delle HDACs, l'espressione di geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, nel differenziamento, nel riparo del DNA e nell'apoptosi (Rosato et al., 2003; Savickiene et al., 2006; Chateaufvieux et al., 2010). Il rimodellamento della cromatina prodotto dal VPA comporta, infatti, un aumento dell'espressione di p21, una CDK associata all'arresto in fase G1 del ciclo cellulare, e la riduzione dei livelli di ciclina A e D1 (Takai et al., 2004; Catalano et al., 2005; Kaiser et al., 2006). Il VPA, inoltre, possiede la capacità di innescare le vie intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi, attraverso l'aumento dell'espressione di fattori pro-apoptotici, come Bik, la diminuzione di proteine anti-apoptotiche, come Bcl-2 e Bcl-XL e il potenziamento dell'attività delle caspasi 3, 8 e 9 (Angelucci et al., 2006; Armeanu et al., 2005; Shen et al., 2005). Nonostante sia opinione comune che le cellule bloccate in G1 evolvano verso il differenziamento, escludendo così l'apoptosi, i fattori che conducono una cellula cancerosa all'arresto del ciclo cellulare, al differenziamento o alla morte restano tuttora ignoti (Catalano et al., 2005). Il blocco della crescita

cellulare, osservato in seguito alla somministrazione di VPA, potrebbe essere, quindi, dovuto a entrambi gli eventi ipotizzati.

Il RSV, una fitoalessina polifenolica prodotta da molte piante come difesa contro agenti patogeni, è stato inizialmente conosciuto e studiato per le sue proprietà antiossidanti, anti-aging, anticoagulanti, antinfiammatorie e vasorilassanti. A livello molecolare, il RSV è in grado di attivare la sirtuina I, una istone deacetilasi di classe III, influenzando direttamente il livello di acetilazione delle code istoniche. La recente introduzione del RSV in ambito oncologico deriva dalla sua capacità, messa in luce per la prima volta in uno studio di Jang e colleghi pubblicato nel 1997, di inibire, *in vitro* e *in vivo*, le tre fasi principali del processo di carcinogenesi: iniziazione, promozione e progressione. E' stato osservato che il RSV possiede proprietà chemiopreventive ed è in grado di ostacolare la progressione tumorale, regolando diversi processi, quali l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi, l'angiogenesi, la metastatizzazione e il differenziamento cellulare (Fontecave et al., 1998; Gusman et al., 2001; Zhou et al., 2005; Suh et al., 1995; Sun et al., 2006).

Il saggio di attività metabolica, effettuato in seguito alla somministrazione di dosi crescenti di RSV, ha rivelato una sensibile riduzione della vitalità cellulare delle linee GBM2, G179 e GBM04 dopo i tempi di esposizione più lunghi al farmaco (48 ore e 72 ore). Nelle restanti linee cellulari non sono state registrate variazioni significative della sopravvivenza cellulare. L'analisi dell'indice mitotico eseguito dopo somministrazione di RSV 100 μ M per 48 ore su sei (GBM2, GBM7, G144, G166, G179 e GliNS2) delle sette linee in studio ha evidenziato complessivamente una marcata riduzione di questo parametro nelle linee GBM2, G144, G166, G179 e GliNS2. In particolare, le linee GBM2 e G179, che avevano mostrato un'inibizione importante dell'attività metabolica dopo somministrazione di RSV, hanno fatto registrare un drastico azzeramento dell'indice mitotico, mentre nelle altre linee la riduzione osservata è stata di entità per lo più eguale a quella riscontrata dopo trattamento con VPA.

L'effetto citotossico/citostatico e l'inibizione della proliferazione del RSV si possono attribuire alla sua capacità di bloccare la sintesi del DNA (Fontecave et al., 1998), di arrestare, in diverse fasi, il ciclo cellulare (Gusman et al., 2001), inibendo l'espressione di chinasi ciclina-dipendenti (Cdk2, Cdk4 e Cdk6) e di cicline (ciclina D1 e ciclina D2) e aumentando l'espressione di p21^{WAF1/CIP1} e p53 (Reagan-Shaw et al., 2004), di indurre apoptosi *in vitro* e *in vivo* attraverso l'attivazione sia della via estrinseca che di quella intrinseca.

Nelle cellule tumorali, mutazioni genetiche ed aberrazioni epigenetiche concorrono nell'istaurare un blocco dei fisiologici processi differenziativi e del normale sviluppo cellulare, oltre a compromettere totalmente il controllo della proliferazione. In questa ottica, si inserisce il concetto di “terapia differenziativa”, concepita come una nuova modalità terapeutica volta a ripristinare e riattivare nelle cellule tumorali i corretti meccanismi endogeni di sviluppo cellulare con la conseguente induzione del differenziamento e la concomitante perdita o alterazione del fenotipo tumorale (Baronchelli et al., 2013; Dela Cruz et al., 2013). Per stabilire se i due farmaci studiati potessero avere un effetto sulla morfologia cellulare delle linee di staminali tumorali prese in considerazione, inducendo una sorta di processo differenziativo, sono stati eseguiti saggi morfologici somministrando VPA e RSV a diverse concentrazioni e per intervalli di tempo differenti. Nel laboratorio in cui ho svolto il mio progetto di dottorato era già stato dimostrato che le sette linee di cellule staminali tumorali da GBM a nostra disposizione, trattate con quattro diverse concentrazioni di VPA (2, 3, 6 e 10 mM) per 24, 48 e 72 ore, presentavano importanti modificazioni morfologiche, se confrontate con colture di controllo non trattate. Il maggior effetto differenziativo del VPA è stato riscontrato dopo 72 ore di trattamento, prevalentemente alle concentrazioni di 2 mM e 3 mM. Nelle colture trattate sono comparse cellule dalla forma allungata o poligonale con diverse estroflessioni e interconnessioni. Le concentrazioni più elevate di VPA (6 mM e 10 mM) hanno provocato un differenziamento più repentino, ma anche un maggior effetto citotossico (a partire dalle 48 ore) con riduzione della proliferazione e morte cellulare. Questo ha permesso di osservare che le concentrazioni di 2 mM e 3 mM erano le migliori per studiare il differenziamento indotto dal VPA. Per questo motivo, in questa tesi, sono state valutate le modificazioni morfologiche indotte nelle sette linee cellulari staminali da glioblastoma multiforme dal trattamento con VPA alla sola concentrazione di 2 mM per tempi di esposizione più lunghi (14 e 30gg). Dopo 14 giorni, ma soprattutto dopo 30 giorni dall'inoculo di VPA nelle colture, l'effetto prodifferenziativo del farmaco si è mostrato in modo evidente in tutte le linee. Le linee G166 e GBM7 hanno presentato, però, un numero elevato di cellule morte e detriti, dimostrando, così, la prevalenza in queste linee dell'effetto citotossico del VPA dopo tempi di trattamento prolungati. Tali cellule sono state, perciò, trattate per 14 e 30 giorni con VPA a concentrazione più bassa (1 mM). Le cellule della linea G166 hanno mostrato, dopo entrambi i tempi di trattamento, un cambiamento di morfologia, indice del potenziale prodifferenziativo del VPA, mentre le cellule della linea GBM7 sono risultate estremamente sensibili al trattamento prolungato con il farmaco anche a tale

concentrazione. Tale linea ha mostrato un'elevata mortalità anche in seguito alla somministrazione di VPA alla concentrazione di 0.5 mM, dimostrando di essere particolarmente sensibile all'esposizione a lungo termine al VPA, anche a concentrazioni molto basse.

Complessivamente, i dati ottenuti dimostrano che la somministrazione di VPA induce importanti modificazioni morfologiche, come riportato anche in letteratura per linee cellulari di diversi tumori (Duena-Gonzalez et al., 2008). Il VPA, perciò, in virtù della sua azione di inibitore delle deacetilasi istoniche, potrebbe contribuire alla riattivazione dei geni che determinano e controllano il differenziamento. Questi geni subiscono un silenziamento transiente nelle cellule staminali normali attraverso il meccanismo dei "domini bivalenti" (Widschwendter et al., 2007; Ohm et al., 2007) e vengono, invece, repressi in modo duraturo nelle cellule staminali tumorali (Rodriguez et al., 2008; Mayor et al., 2011).

Il trattamento delle medesime sette linee di cellule staminali tumorali da GBM con diverse concentrazioni di RSV per 24, 48 e 72 ore non ha indotto modificazioni morfologiche apprezzabili. L'unica eccezione è data dalle cellule della linea GBM2 che hanno mostrato cambiamenti molto modesti della morfologia dopo 48 e 72 ore di trattamento. In alcune linee cellulari (G179, GliNS2 e GBM7), alla concentrazione più elevata di farmaco, si è evidenziato un importante effetto citotossico, dimostrato dalla presenza di cellule morte e detriti nella coltura. Secondo quanto osservato in questo studio, il RSV non sembra avere un effetto prodifferenziativo evidente: solo le cellule della linea GBM2 hanno mostrato alterazioni della morfologia, tanto lievi quanto trascurabili. Al contrario, in letteratura è stata documentata l'attività prodifferenziativa del RSV, ad esempio, in cellule derivate da leucemia promielocitica (HL-60) (Suh et al., 1995). In uno studio di Castino e collaboratori del 2011, inoltre, è stata osservata la capacità del RSV di indurre il differenziamento in senso gliale e neuronale in cellule della linea di glioma U87MG e colture primarie da glioblastoma: l'esposizione per 96 ore a questo farmaco causava nelle linee cellulari menzionate la riduzione dell'espressione di Nestina, un marcatore di staminalità, e l'incremento dell'espressione di GFAP e β III tubulina, marcatori di differenziamento atrociario e neuronale.

E' opportuno sottolineare che le linee cellulari a nostra disposizione, se coltivate in presenza di siero fetale bovino (RPMI 10% FCS) per 14 giorni e 30 giorni, differenziano in cellule dalla morfologia appiattita e dotate di estroflessioni cellulari, sottolineando il loro potenziale differenziativo. Questo comportamento delle BTSCs in

terreno addizionato con siero bovino è stato descritto anche in letteratura (Ignatova et al., 2002; Singh et al., 2003).

I dati ottenuti dai saggi morfologici sono stati validati a livello molecolare, al fine di verificare l'espressione di proteine specifiche del differenziamento dopo trattamento con VPA, l'unico farmaco dei due testati ad aver determinato modificazioni della morfologia cellulare. Poiché le cellule staminali tumorali da GBM rappresentano, secondo la teoria delle CSCs, la controparte alterata delle cellule staminali neurali, si è deciso di verificare, attraverso saggi di immunofluorescenza, l'espressione di marcatori specifici per il differenziamento nei tre diversi *lineage* neurali, come GFAP, β III tubulina e MBP, associandoli anche a marcatori di staminalità, come CD133 e Nestina.

In una fase antecedente a questa tesi, l'immunofluorescenza, eseguita sulle sette linee cellulari trattate per 72h con VPA 2 mM, aveva mostrato che le cellule staminali tumorali esprimevano contemporaneamente marcatori di staminalità e marcatori di differenziamento in proporzioni variabili anche dopo il trattamento. La coespressione delle due tipologie di marcatori era già stata osservata dal gruppo di Ignatova nel 2002, il quale aveva descritto la permanenza dell'espressione di Nestina contemporaneamente alla comparsa di quelle di GFAP e β III tubulina, dopo differenziamento indotto da terreno con siero. Nel nostro caso, questo effetto avrebbe potuto essere provocato dal tempo di induzione farmacologica, probabilmente troppo breve per permettere un differenziamento terminale completo delle cellule staminali tumorali. Sulla base di tale ipotesi, in questo studio, l'immunofluorescenza è stata eseguita su sei linee di cellule staminali tumorali da GBM esposte per 14 e 30 giorni a VPA 2 mM (GBM2, GBM04, G144, G179 e GliNS2) o 1 mM (G166). Il saggio di immunofluorescenza non è stato eseguito sulla linea GBM7 poiché, come menzionato in precedenza, il trattamento prolungato con VPA, anche a concentrazioni molto basse (0,5 mM), è risultato tossico per tali cellule. I risultati ottenuti hanno evidenziato, ancora una volta, una coespressione di marcatori di staminalità e differenziamento soltanto nelle linee GBM2, G179 e GliNS2. Questo potrebbe essere nuovamente spiegato dal fatto che le GSCs, al momento dell'osservazione con microscopio confocale a fluorescenza, potrebbero ancora non essere terminalmente differenziate, uno stadio che queste cellule potrebbero essere incapaci di raggiungere, a causa di mutazioni o delezioni a carico di geni importanti per il differenziamento. Questi ultimi, perciò, nonostante il VPA promuova generalmente uno stato cromatinico attivo, non sarebbero comunque in grado di svolgere la loro funzione. A riprova di questa ipotesi, è opportuno segnalare la delezione a carico della citobanda 4q22.3 nella linea GBM2, rilevata dal nostro gruppo

di lavoro tramite cariotipizzazione molecolare con *array* CGH (Baronchelli et al., 2013): in tale regione cromosomica mappa il gene *BMPR1B*, il quale è coinvolto nel differenziamento astrocitario. Bisogna anche considerare la semplicità del modello di trattamento *in vitro* proposto, il quale potrebbe anche non essere adeguato per consentire il superamento completo del blocco differenziativo presente in queste cellule; infatti, il VPA da solo potrebbe non essere sufficiente al fine di riattivare le regioni cromatiniche necessarie, richiedendo di conseguenza l'ausilio di un altro composto *ad hoc* ad azione epigenetica, come ad esempio un agente demetilante (Zhu et al., 2003). Inoltre, è possibile che si verifichi l'insorgenza di meccanismi di resistenza al VPA o che venga operata una selezione clonale nel corso del trattamento a favore delle cellule resistenti al VPA (Liu et al., 2009; Juengel et al., 2013).

Dopo 30 giorni di trattamento il 32,71% delle cellule della linea G144 hanno espresso solamente il marcatore di differenziamento GFAP, una proteina citoplasmatica filamentosa tipica degli astrociti, facendo presupporre un differenziamento preferenziale in senso astrocitico, mentre il 100% delle cellule della linea GBM04 hanno espresso il solo marcatore MBP, una proteina basica di membrana tipica degli oligodendrociti, indicando un differenziamento in senso oligodendrocitico. Le cellule della linea G166 (trattate con VPA 1 mM), che dopo 14 giorni di esposizione al farmaco esprimevano percentuali elevate di β III tubulina, GFAP e MBP, evidenziando un possibile differenziamento verso tutti i *lineages* neurali, dopo 30 giorni non hanno espresso più nessuno di questi marcatori, indicando probabilmente un tentativo di regressione ad uno stato indifferenziato, nell'impossibilità di completare il processo differenziativo. Un'altra ipotesi contempla la possibilità che le cellule di questa linea siano andate incontro ad un processo di transdifferenziamento: è stato, infatti, dimostrato che le GSCs sono in grado di transdifferenziare in cellule di *lineage* diversi da quello neurale, generando ad esempio cellule endoteliali (Soda et al., 2011).

Per quanto riguarda le restanti linee cellulari considerate, l'espressione dei marcatori di staminalità e differenziamento è risultata molto variabile e non è stato possibile individuare un differenziamento preferenziale in uno dei *lineages* neurali. Una percentuale elevata di cellule delle linee GBM2 e G179 ha coespresso marcatori di differenziamento e almeno un marcatore di staminalità dopo entrambi i tempi di trattamento. Ad esempio, l'80-100% delle cellule della linea GliNS2 ha espresso il marcatore β III tubulina e un marcatore di staminalità dopo 14 e 30 giorni di esposizione al farmaco, facendo ipotizzare che tali cellule si trovassero in uno stato intermedio tra quello staminale e quello differenziato in senso neuronale. In conclusione, si può

osservare che l'esposizione delle cellule al VPA per tempi più lunghi ha permesso in alcune linee di rivelare il differenziamento preferenziale verso specifici *lineages* neurali. Resta da indagare se il blocco differenziativo evidenziato in altre linee sia imputabile ad eventi mutazionali in geni implicati in questo processo o ad altri eventi.

Una volta caratterizzato il differenziamento tramite immunofluorescenza, l'analisi è stata ampliata verificando gli effetti di VPA e RSV sulla motilità delle linee cellulari in esame, un aspetto cruciale in quanto l'invasione del parenchima cerebrale è una caratteristica distintiva dei gliomi maligni (Lefranc et al., 2005). A tal fine sono stati eseguiti saggi di migrazione cellulare, tramite *Wound Healing Assay*, su 6 linee di cellule staminali tumorali da GBM (GBM2, GBM7, GBM04, G144, G179 e GliNS2), trattate con diverse concentrazioni di VPA o RSV per 48, 72 e 96 ore. La linea G166 è stata esclusa da questa analisi poiché non è stato possibile ottenere, in coltura, un tappeto cellulare uniforme, necessario per eseguire il saggio.

La somministrazione di VPA a concentrazioni crescenti ha determinato una riduzione marcata della motilità cellulare solo nelle linee GBM7 e GliNS2. Nella linea GBM04, si è registrata una blanda diminuzione della migrazione relativa soltanto alle concentrazioni di 5 e 10 mM, mentre un aumento di questo parametro è stato osservato alle concentrazioni più basse. In quest'ultima linea e nella GBM7 si è evidenziato una sorta di *recovery* della capacità migratoria con l'aumentare del tempo di trattamento. Nelle restanti linee cellulari analizzate (GBM2, G179, G144), il VPA ha avuto un effetto promuovente sulla capacità migratoria, maggiormente a 48 e 72 ore di trattamento. Per quanto concerne l'influenza del VPA sulla motilità cellulare, vi è dunque un'elevata eterogeneità di risposta, che trova riscontro in un lavoro di Knupfer e collaboratori del 2001, in cui vengono rilevate tendenze antitetiche di questo parametro in 4 linee di glioma esposte al VPA. E' doveroso sottolineare anche che alcuni studi presenti in letteratura avevano messo in luce la capacità del VPA di inibire la migrazione cellulare nei gliomi attraverso la riduzione dell'espressione delle metalloproteasi 2 e 9 (MMP2 e MMP9) e l'aumento di quella del loro inibitore TIMP-1 (Papi et al., 2010), ma anche attraverso la soppressione della secrezione di interleuchina 6 (IL-6), inibendo di fatto il pathway di NF- κ B (Ichiyama et al., 2000).

Il trattamento con RSV, già dopo 48 ore, ha determinato un'inibizione più uniforme sulla capacità migratoria delle linee cellulari in esame, anche se permane un certo grado di eterogeneità interlineare. La riduzione della motilità cellulare è risultata palese già dopo 48 ore nelle linee G144, GBM7 e GBM2, mentre nelle altre linee si è evidenziata soprattutto a 96 ore di esposizione al farmaco. L'inibizione della motilità cellulare da

parte del RSV potrebbe essere dovuta alla sua capacità di ridurre l'espressione o l'attività delle metalloproteasi, come MMP-2 e MMP-9, e di downregolare le proteine SPARC, responsabili del rimodellamento della matrice extracellulare (Sun et al., 2006; Tang et al., 2008; Yu et al., 2007; Gagliano et al., 2005). Il RSV potrebbe, quindi, essere considerato nel contesto di una futura strategia terapeutica per la cura del glioblastoma multiforme mirata ad ostacolare l'infiltrazione del tessuto cerebrale sano.

L'alterazione dei processi di differenziamento, della regolazione del *self-renewal* e della migrazione cellulare, caratteristiche delle cellule staminali tumorali, potrebbero essere dovute ad alterazioni genetiche e/o epigenetiche a carico dei geni coinvolti nel *pathway* di Wnt, il quale consente l'attivazione di tre diverse vie di segnalazione intracellulare, a seconda dei ligandi e dei recettori coinvolti: una via canonica β catenina dipendente e 2 vie non canoniche β catenina indipendenti (Wnt/ Ca^{2+} e *Planar Cell Polarity*) (Cadigan et al., 2006). Per queste ragioni, l'utilizzo di composti in grado di modulare la cascata di trasduzione del segnale di Wnt potrebbe rappresentare un interessante approccio terapeutico. Nel glioblastoma multiforme, i geni coinvolti in tale via di segnalazione non sono frequentemente interessati da mutazioni o aberrazioni genetiche, al contrario di altri tipi di tumore come il cancro del colon; è stata, invece, evidenziata la presenza di alterazioni epigenetiche a carico di alcuni interpreti di questo *pathway*, come ad esempio DKK1, SFRP1 e WIF1 (Foltz et al., 2010; Ying et al., 2009). In questa tesi è stato eseguito uno studio di espressione per valutare se il VPA e il RSV, in virtù della loro capacità di influenzare il *chromatin remodelling* mediante la modulazione dell'attività di alcune classi di istone deacetilasi, fossero in grado di condizionare l'espressione di geni coinvolti nel *pathway* di Wnt. Tali farmaci, infatti, influenzando direttamente sui livelli di acetilazione istonica e indirettamente sul grado di metilazione del DNA, potrebbero modificare l'espressione genica, ristabilendo la corretta regolazione dei meccanismi coinvolti nel mantenimento della staminalità, nel differenziamento e nella migrazione cellulare. A tal fine, è stata eseguita un'analisi di espressione, utilizzando dapprima dei *PCR array* contenenti i *primer* di 84 geni del *pathway* molecolare di Wnt, analizzando RNA proveniente da cellule staminali tumorali delle linee GBM2 e G144 trattate per 96 ore con VPA 2 mM e non trattate. Il trattamento con VPA ha causato, in entrambe le linee cellulari considerate, alcune variazioni importanti nell'espressione di ligandi, recettori, inibitori del *pathway* di Wnt canonico e non, proteine in grado di associarsi a β catenina al momento della trascrizione e geni *target*. In particolare, è stata osservata in entrambe le linee cellulari una riduzione dell'espressione di β catenina, i cui livelli proteici e di mRNA, risultano

aumentati in molti tumori, tra i quali gli astrocitomi di alto grado, e sembrano correlare con la malignità della neoplasia e una prognosi sfavorevole (Sareddy et al., 2009; Liu et al., 2011; Liu et al., 2010). I livelli proteici di β catenina sono stati, in seguito, analizzati tramite immunoblot, il quale ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa dei livelli di β catenina nucleare in cellule di entrambe le linee trattate con VPA 2 mM per 96 ore rispetto ai controlli non trattati, indice di una diminuita migrazione nel nucleo di questa proteina; per quanto riguarda i livelli citoplasmatici di β catenina, è stato osservato un aumento non statisticamente significativo dei livelli della proteina in questione nella linea GBM2, mentre nella linea G144 una diminuzione. Anche l'espressione della maggior parte dei fattori capaci di associarsi ad essa risulta *down-regolata*: tra questi vi sono Pygo1, che, insieme a Pygo 2, forma un complesso in grado di favorire l'accumulo di β catenina nel nucleo e la trascrizione TCF-dipendente nel tumore del colon-retto (Kramps et al., 2002; Thompson et al., 2002), e *BCL9*, una proteina adattatrice che facilita il legame tra Pygo1/2 e β catenina e promuove l'attività trascrizionale di quest'ultima (De la Roche et al., 2008). *BCL9*, espresso in modo aberrante nel mieloma multiplo e nel cancro del colon-retto, favorisce la proliferazione, la migrazione cellulare, la formazione di metastasi e la transizione epitelio-mesenchimale aumentando l'attività trascrizionale di β catenina. E' stato dimostrato che il *knockdown* del gene *BCL9* aumenta in modo significativo la sopravvivenza in xenograft murini di mieloma multiplo e tumore del colon, attraverso la riduzione delle dimensioni del tumore, della metastatizzazione e della neoangiogenesi, dovute alla *down-regolazione* di geni target di β catenina, come *C-MYC*, *CCND1*, *CD44* e *VEGF* (Mani et al., 2009).

Il trattamento con VPA, inoltre, riduce l'espressione di *TCF7L1*, un fattore trascrizionale ritrovato altamente espresso nelle BTSCs, avente come geni *target* *OCT4* e *Nanog*, coinvolti nel mantenimento del *self-renewal* (Cole et al., 2008; Pereira et al., 2006), e *LEF1*, un fattore di trascrizione che, favorendo la trascrizione di geni come *CCND1*, *C-MYC* e *MMP7*, promuove la proliferazione e l'invasività tumorale. Quest'ultimo è stato ritrovato altamente espresso e associato a cattiva prognosi inizialmente in tumori ematologici, come la leucemia linfatica cronica a cellule B, ma in seguito anche in tumori solidi, come il cancro alla prostata e al seno (Wang et al., 2005). Dopo trattamento con VPA risultano *down-regolati* anche la maggior parte dei recettori del *pathway* di Wnt, compresi *LRP5* e *LRP6*, due corecettori necessari per l'attivazione della via di segnalazione intracellulare β catenina-mediata. Questi primi dati sembrerebbero suggerire un'inibizione del *pathway* di Wnt canonico e una riduzione

dell'espressione di geni *target* di β catenina, tra cui MYC, CCND3 e FOSL1, in grado di mantenere il *self-renewal*, potenziare l'attività proliferativa delle CSCs e mantenerne lo stato indifferenziato, spiegando, così, l'effetto prodifferenziativo del VPA.

Sono stati ottenuti, tuttavia, anche dati che sembrano essere in contrasto con tale ipotesi. In seguito a trattamento con VPA, infatti, risulta *down-regolata* anche la maggior parte degli inibitori del *pathway* canonico di Wnt, ad eccezione, però, di CXXC4, SFRP1, SFRP4, WIF1 e DKK1. Le proteine Wif1, Sfrp1 e Sfrp4 agiscono come *decoy receptors* solubili, Dkk1 compromette l'attività del corecettore LRP5/6 (Moon et Brown 2002), mentre Cxxc4, la cui diminuita espressione è associata allo sviluppo del carcinoma renale, inibisce Dishevelled (Kojima et al., 2009). L'*up-regolazione* dei geni DKK1, SFRP1 e WIF1 evidenziata in questo studio dopo trattamento con VPA trova riscontro in uno studio di Foltz e colleghi del 2010, i quali hanno messo in luce la riattivazione dell'espressione di questi antagonisti del *pathway* di WNT in cellule di GBM dopo trattamento con Tricostatina A, un altro HDACi; inoltre, l'*over-espressione* di DKK1 è nota sensibilizzare linee cellulari di GBM all'apoptosi indotta da agenti alchilanti del DNA (Shou et al., 2002). Una riduzione dell'espressione è stata riscontrata anche per alcuni fattori in grado di regolare negativamente il *pathway* di Wnt o indurre l'espressione di geni target importanti per il differenziamento cellulare, legandosi a β catenina. Tra questi vi è EP300, un gene codificante per una HAT che è coinvolta nell'induzione del differenziamento astrocitario e nell'inibizione dell'invasività in linee cellulari di GBM (Panicker et al., 2010). Questo gene mappa in posizione 22q13, una regione che presenta una frequente perdita di eterozigosi nei tumori del colon, mammella e ovaio; il silenziamento di EP300 potrebbe essere ottenuto, in alternativa, anche mediante meccanismi epigenetici, come la metilazione del promotore (Bryan et al., 2002). Uno studio di Teo e colleghi del 2010 ha dimostrato che la formazione del complesso p300- β catenina è fondamentale per la trascrizione di geni responsabili del processo di differenziamento cellulare. E' stato ipotizzato che lo *switch* tra il complesso CREBBP- β catenina, responsabile del mantenimento della staminalità e della proliferazione cellulare, e il complesso p300- β catenina possa essere dovuto alla fosforilazione di p300 da parte della PKC attivata dal *pathway* di Wnt non canonico, mettendo in luce il complesso *crosstalk* esistente tra le diverse vie di segnalazione intracellulare Wnt-mediate.

Dopo trattamento con VPA risultano downregolati anche TLE2, AES e CTNNBIP1, un regolatore negativo del *pathway* di Wnt in grado di prevenire l'interazione di β catenina con i fattori di trascrizione della famiglia TCF (Tago et al., 2000), CTBP1 e CTBP2,

codificanti per due proteine che, interagendo con le istone-deacetilasi, inibiscono l'attività di TCF4, avente come *target* geni coinvolti nella proliferazione e nella migrazione cellulare (ad esempio C-MYC) (Stadeli et al., 2006; Yamaguchi et al., 2001). Recentemente, è stato dimostrato che *CTBP1* risulta *down*-regolato o è inattivato tramite uno splicing alternativo che lo priva dell'esone 4 in melanoma, determinando un aumento della capacità migratoria. La forma alternativa della proteina CtBP1 è stata ritrovata anche in altre neoplasie (tumore del seno, colon-retto, carcinoma epatocellulare) facendo ipotizzare un suo ruolo chiave nell'invasività e nella progressione di molti tumori (Winklmeier et al., 2009).

Risultano, invece, *up*-regolati dopo trattamento con VPA i geni *FOXN1* e *TCF7*. Quest'ultimo, in particolare, codifica per un fattore in grado di regolare la trascrizione di geni coinvolti nel mantenimento della staminalità; infatti, in uno studio di Wu e colleghi del 2012, è stato dimostrato che TCF7 è il fattore maggiormente *down*-regolato quando le cellule staminali ematopoietiche CD34⁺ differenziano in cellule CD34⁻.

Successivamente, l'analisi d'espressione del *pathway* di Wnt è stata estesa a tutte le linee, valutando l'effetto del trattamento con VPA 2 mM per 96 ore e introducendo anche lo studio delle modificazioni d'espressione indotte dal trattamento con RSV 100 µM per 96 ore. In virtù dei risultati precedentemente ottenuti, sono stati acquistati dei *PCR array custom* contenenti i *primer* relativi a 7 geni selezionati (WNT1, FZD4, CTNNB1, EP300, CREBBP, TCF7 e MYC), i quali intervengono a livelli diversi nella via di trasduzione del segnale del *pathway* di Wnt.

Il trattamento con VPA ha determinato un aumento dell'espressione del ligando WNT1 e del recettore FZD4, facendo ipotizzare un aumento della segnalazione a carico del *pathway* canonico di Wnt con il probabile risultato finale di promuovere la proliferazione e il *self renewal*. A supporto di questa ipotesi, un lavoro di Jin e collaboratori del 2011 ha dimostrato che FZD4 è *up*-regolato in una sottopopolazione di CSCs da GBM, selezionata in base alla capacità di migrare nel lobo cerebrale controlaterale a quello dell'impianto nelle encefalo di topo, e che tale gene regola il mantenimento della staminalità e dell'invasività, promuovendo la transizione epitelio-mesenchimale. Nonostante l'*up*-regolazione a carico dei geni a monte del *pathway*, l'espressione di β catenina non risente affatto dell'aumento della stimolazione probabilmente scaturita dal legame ligando-recettore, risultando *down*-regolata o invariata. Tale evento può essere interpretato positivamente, in quanto generalmente l'aumento dell'espressione e l'attivazione di β catenina promuovono nei gliomi la migrazione cellulare, l'angiogenesi, la tumorigenesi e la radioresistenza (Zhang et al.,

2010; Williams et al., 2011; Bowman et al., 2011; Kim et al., 2012). E' doveroso sottolineare, tuttavia, il contrasto esistente con altri dati presenti in letteratura, i quali riportano che il VPA, in virtù della sua capacità di inibire GSK3 β (una chinasi che, fosforilando β catenina, la indirizza verso la degradazione), determina l'attivazione del Wnt *pathway* β catenina-dipendente, provocando il differenziamento in cellule di neuroblastoma e l'arresto del ciclo cellulare in progenitori neurali normali, tramite l'attivazione del pathway di ERK e di p21 (Chen et al., 1999; Jung et al., 2008); inoltre, l'attivazione del complesso β catenina-TCF7, mediata da WNT3A, è stata correlata all'induzione di differenziamento neuronale in CSCs da GBM (Rampazzo et al., 2013). Le istone acetiltrasferasi EP300 e CREBBP, le quali sono coattivatori trascrizionali, e il fattore di trascrizione TCF7 sono risultati generalmente *down*-regolati o invariati, indicando una probabile riduzione complessiva della trascrizione a valle, derivante proprio della diminuzione dell'attivazione della cromatina che ne deriverebbe. Infine, l'espressione del gene *target* MYC rispecchia l'andamento generale mostrandosi *down*-regolata o invariata, suggerendo una possibile inibizione del *self-renewal* mediata dal VPA: infatti, al contrario, l'aumento dell'espressione di MYC viene associata all'inibizione del differenziamento astrocitario e al mantenimento della staminalità in cellule di GBM (Panicker et al., 2010). I risultati ottenuti sembrano indicare che il VPA è in grado di inibire il pathway di WNT canonico, concordemente con gli effetti prodifferenziativi osservati durante l'analisi della morfologia e gli esperimenti di immunofluorescenza.

Il trattamento con RSV 100 μ M per 96 ore ha provocato complessivamente un'*up*-regolazione di WNT1, solo parzialmente accoppiata con l'*up*-regolazione di FZD4, mentre β catenina ed EP300 sono rimaste per lo più invariate. Invece, per quanto riguarda CREBBP e TCF7, la situazione è più eterogenea. L'espressione dell'oncogene MYC è risultata *up*-regolata dal trattamento con RSV in 5 linee su 7, indicando probabilmente un aumento complessivo della trascrizione dei geni *target* del *pathway* canonico di Wnt determinata dal RSV. In questo studio, dunque, il RSV sembra avere un'azione promuovente sul *pathway* canonico di Wnt. I dati presenti in letteratura sono discordanti per quanto concerne l'effetto del RSV sul *pathway* molecolare di Wnt. In particolare, è stato riportato che il RSV aumenta la via di segnalazione di Wnt promuovendo l'osteoblastogenesi in cellule mesenchimali staminali e l'angiogenesi in cellule endoteliali attraverso l'inibizione di GSK3 β mediata da ERK, il quale determina la stabilizzazione e la migrazione nucleare di β catenina (Zhou et al., 2009; Wang et al., 2010). Altri studi evidenziano che il RSV, a concentrazioni minori di 10 μ M, è in grado

di inibire la via di segnalazione di Wnt in linee cellulari di tumore del colon, riducendo la localizzazione nucleare di β catenina attraverso la *down*-regolazione di LGS e PYGO1 (Hope et al., 2008) e impedendo la formazione del complesso β catenina-TCF4 (Chen et al., 2012); il farmaco in questione, alla concentrazione di 100-150 μ M, è in grado di inibire la proliferazione di cellule di carcinoma del colon indotte con IGF1, *down*-regolando il recettore di IGF1 e inibendo a valle i *pathway* di Akt e Wnt (Vanamala et al., 2010).

Complessivamente, i dati presentati in questo studio ci consentono di affermare che il VPA con la sua azione antiproliferativa, prodifferenziativa e inibitoria del *pathway* canonico di Wnt, esercitata sulle GSCs, può essere un farmaco candidato per l'utilizzo nel contesto di una terapia GSCs-*targeted* soprattutto in combinazione con chemioterapici standard; infatti, il VPA, in virtù della sua attività inibitoria nei confronti delle HDACs, potrebbe contribuire alla riattivazione di geni importanti per il differenziamento e di geni oncosoppressori, determinando di conseguenza il differenziamento delle CSCs, una riduzione dell'aggressività della neoplasia e una plausibile sensibilizzazione ad altri farmaci. E' opportuno, a questo proposito, sottolineare che il VPA è in grado di migliorare la sensibilità al temozolomide (TMZ), farmaco che ad oggi costituisce lo standard terapeutico insieme alla radioterapia, tramite l'induzione dell'apoptosi, l'aumento dell'accessibilità al DNA da parte del TMZ e la *down*-regolazione di MGMT (Chen et al., 2011; Van Niftherik et al., 2012; Ryu et al., 2012).

L'effetto inibitorio sull'indice mitotico e sulla capacità migratoria indotto dal RSV nei confronti delle linee di CSCs da GBM analizzate potrebbe essere sfruttato in futuro nel contesto di una terapia finalizzata all'eliminazione della componente staminale del tumore e alla riduzione dell'invasività, il quale è un aspetto cruciale in funzione della diminuzione del rischio di recidiva. Inoltre, è riportato in letteratura che anche il RSV è in grado di agire terapeuticamente in sinergia con il TMZ, sensibilizzando cellule di glioblastoma inizialmente resistenti a quest'ultimo o aumentandone gli effetti anticancro tramite l'induzione della catastrofe mitotica, la *down*-regolazione di MGMT e il blocco dell'autofagia (Filippi-Chiela et al., 2013; Huang et al., 2012; Lin et al., 2012).

In definitiva, i risultati ottenuti incoraggiano l'uso di farmaci epigenetici nel contesto di una futura terapia per la cura del glioblastoma multiforme, anche in combinazione con altri composti. Sono necessari, tuttavia, ulteriori approfondimenti su alcuni aspetti chiave emersi in questo percorso, come ad esempio il superamento del blocco differenziativo e la comprensione profonda del ruolo del *pathway* di Wnt nelle GSCs,

unitamente allo studio degli effetti conseguenti alla sua modulazione. I dati dovranno essere validati anche da opportuni studi *in vivo*.

SUPPLEMENTI

Tabella S1. Analisi statistica (p-values, t-test) dei dati derivanti dal saggio di vitalità cellulare *MTT assay*, confrontando i valori dell'attività metabolica delle colture non trattate con quelli di ogni specifico trattamento (VPA e RSV). (n.s.= non statisticamente significativo)

VPA																		
Dose	0,5 mM			1 mM			3 mM			6 mM			10 mM			20 mM		
Tempo(hs)	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
GBM2	n.s.	.01	.0001	.01	.001	.0001	.01	.0001	.0001	.001	.0001	.0001	.001	.0001	.0001	.0001	.0001	.0001
GBM7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	.01	n.s.	n.s.	.001
GBM04	n.s.	n.s.	.001	n.s.	n.s.	.001	.01	.01	.01	.001	.01	.001	.01	.01	.0001	.0001	.001	.0001
G144	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	.05	n.s.	n.s.	.01	n.s.	n.s.	.01	n.s.	n.s.	.001	.05	n.s.	.001
G166	n.s.	.01	n.s.	.01	.05	.01	.001	.01	.01	.01	.01	.001	.01	.01	.01	.001	.001	.001
G179	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	.001	n.s.	n.s.	.0001	n.s.	.01	.0001	n.s.	.01	.0001
GliNS2	n.s.	n.s.	.001	n.s.	n.s.	.001	n.s.	n.s.	.01	n.s.	n.s.	.05	n.s.	n.s.	.001	n.s.	n.s.	.0001

RSV												
Dose	10 µM			50 µM			100 µM			200 µM		
Tempo(hs)	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
GBM2	n.s.	.001	.01	n.s.	.0001	.0001	n.s.	.0001	.0001	n.s.	.0001	.0001
GBM7	n.s.	n.s.	.0001	n.s.	.05	.0001	n.s.	.05	.01	n.s.	.05	.01
GBM04	n.s.	.001	.01	n.s.	.0001	.01	.05	.0001	.001	.0001	.0001	.0001
G144	n.s.	.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	.01	.01	.01	.001	.05	.001
G166	.01	.001	.01	.001	.01	.05	.05	.001	n.s.	.05	.001	.0001
G179	n.s.	.01	.05	n.s.	.0001	.0001	.05	.0001	.0001	n.s.	.0001	.0001
GliNS2	n.s.	n.s.	.001	.001	.05	n.s.	.05	.01	.001	.0001	.01	n.s.

Tabella S2. Analisi statistica (p-values, t-test) dei dati derivanti dal saggio di migrazione *Wound healing assay*, confrontando i valori di migrazione delle colture trattate con VPA e RSV rispetto al controllo. (n.s.= non statisticamente significativo)

VPA													
Dose		1 mM			2 mM			5 mM			10 mM		
Tempo(hs)	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96	
GBM2	n.s.	n.s.	n.s.	.001	.01	n.s.	.0001	.001	.01	.01	n.s.	n.s.	
GBM7	n.s.	.01	.001	.05	n.s.	n.s.	.01	.05	n.s.	.0001	.0001	.05	
GBM04	.01	.001	.0001	n.s.	n.s.	.01	.0001	.01	n.s.	.001	n.s.	n.s.	
G144	.01	n.s.	n.s.	.01	n.s.	n.s.	.001	n.s.	n.s.	.001	n.s.	n.s.	
G179	n.s.	n.s.	.01	.01	.01	.001	.01	.001	.001	n.s.	n.s.	n.s.	
GliNS2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	.001	.05	n.s.	.01	.01	

RSV													
Dose		10 μM			50 μM			100 μM			200 μM		
Tempo(hs)	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96	
GBM2	n.s.	n.s.	.01	n.s.	.05	.001	.0001	.01	.001	.0001	.01	.0001	
GBM7	.01	.05	.001	.05	.05	.0001	.01	.05	.0001	.01	.0001	.0001	
GBM04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	.05	.0001	n.s.	n.s.	.0001	
G144	.001	n.s.	n.s.	.01	n.s.	.05	.001	n.s.	n.s.	.0001	.01	.01	
G179	n.s.	n.s.	.001	n.s.	n.s.	.01	n.s.	.001	.0001	.01	.0001	.0001	
GliNS2	n.s.	n.s.	.05	n.s.	n.s.	.001	n.s.	n.s.	.0001	.05	.0001	.0001	

Bibliografia

- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. *Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies*. *Anticancer Res*. 2004; 24, 2783–2840.
- Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H, Jair KW, van Engeland M, Esteller M, Sakai H, Ren CY, Yuasa Y, Herman JG, and Baylin SB. *GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer*. *Mol Cell Biol* 2003; 23, 8429-8439
- Akiyama T. *Wnt/ β -catenin signaling*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2000; 11 273- 282.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 2003; 100:3983-88.
- Alaminos M, Dávalos V, Ropero S, Setién F, Paz MF, Herranz M, Fraga MF, Mora J, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. *EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma*. *Cancer Research* 2005; 65:2565–71.
- Amatya VJ, Naumann U, Weller M, Ohgaki H. *TP53 promoter methylation in human gliomas*. *Acta Neuropathology* 2005; 110:178–84.
- Angelucci A, Valentini A, Millimaggi D, Gravina GL, Miano R, Dolo V, Vicentini C, Bologna M, Federici G, Bernardini S. *Valproic acid induces apoptosis in prostate carcinoma cell lines by activation of multiple death pathways*. *Anticancer Drugs* 2006; 17:1141-1150.
- Armeanu S, Pathil A, Venturelli S, Mascagni P, Weiss TS, Gottlicher M, Gregor M, Lauer UM, Bitzer M. *Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357*. *J. Hepatol*. 2005; 42:210-217.
- Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, and DePinho RA. *Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice*. *Nature* 2000; 406, 641-645.
- Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jørgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merkenschlager M, Fisher AG. *Chromatin signatures of pluripotent cell lines*. *Nat.Cell Biol*. 2006; 8:532–538.
- Bacon CL, Gallagher HC, Haughey JC, and Regan CM. *Antiproliferative action of valproate is associated with aberrant expression and nuclear translocation of cyclin D3 during the C6 glioma G1 phase*. *J Neurochem*, 2002; 83, 12-19.
- Baeza N, Weller M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. *PTEN methylation and expression in glioblastomas*. *Acta Neuropathology* 2003; 106:479–85.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. *Nature*. 2006 Dec 7;444(7120):756-60. Epub 2006 Oct 18.
- Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang JL, Hacker TA, Wang Y, Raederstorff D, Morrow J D, Leeuwenburgh C, Allison DB, Saupe KW, Cartee GD, Weindruch R, Prolla TA. *A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice*. *PLoS One* 2008; 3:e2264.
- Baronchelli S, Bentivegna A, Redaelli S, Riva G, Butta V, Paoletta L, Isimbaldi G, Miozzo M, Tabano S, Daga A, Marubbi D, Cattaneo M, Biunno I, Dalprà L. *Delineating the cytogenomic and epigenomic landscapes of glioma stem cell lines*. *PLoS One*. 2013;8(2):e57462. doi: 10.1371/journal.pone.0057462. Epub 2013 Feb 28.
- Baur JA, Sinclair DA. *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2006; 5, 493–506.
- Baylin SB. *DNA methylation and gene silencing in cancer*. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2 Suppl 1, S4-11.
- Beale RC, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Harris RS, Rada C, and Neuberger MS. *Comparison of the differential context-dependence of DNA deamination by APOBEC enzymes: correlation with mutation spectra in vivo*. *J Mol Biol* 2004; 337, 585-596.
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. *Primary brain tumours in adults*. *Lancet* 2003; 361:323–31.
- Benítez JA, Arregui L, Cabrera G, and Segovia J. *Valproic acid induces polarization, neuronal-like differentiation of a subpopulation of C6 glioma cells and selectively regulates transgene expression*. *Neuroscience* 2008; 156, 911-920.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhata R, and Shilatifard A. *An operational definition of epigenetics*. *Genes Dev* 2009; 23, 781-783.

- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells*. Cell 2006; 125: 315–326.
- Bestor TH. *The methyltransferase of mammals*. Hum Mol Genet, 2000; 9(16), 2395–402.
- Bhardwaj G, Sethi S, Vadhan-Raj C, Bueso-Ramos Y, Takada U, Gaur AS, Nair S, Shishodia BB, Aggarwal. *Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells*. Blood, 2007; 109, 2293–2302.
- Bhattacharya S, Das A, Mallya K, Ahmad I. Maintenance of retinal stem cells by *Abcg2* is regulated by notch signaling. J Cell Sci. 2007 Aug 1;120(Pt 15):2652–62. Epub 2007 Jul 17.
- Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, Cinatl J Jr. Evolving anticancer drug *valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies*. Med Res Rev. 2005 Jul;25(4):383–97.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. Nat Rev Drug Discov. 2006 Sep;5(9):769–84.
- Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, Kruchko C, McCarthy BJ, Rajaraman P, Schwartzbaum JA, Sadetzki S, Schlehofer B, Tihan T, Wiemels JL, Wrensch M, Buffler PA; Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium*. Cancer. 2008;113:1953–68.
- Bonnet D, Dick JE. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nature Medicine 1997; 3:730–37.
- Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, Booth TD, Crowell JA, Perloff M, Gescher AJ, Steward WP, Brenner DE. *Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent*. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 2007; 16, 1246–1252.
- Bourchis D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, and Bestor TH. *Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints*. Science 2001; 294, 2536–2539.
- Bowman A, Nusse R. *Location, location, location: FoxM1 mediates β -catenin nuclear translocation and promotes glioma tumorigenesis*. Cancer Cell. 2011 Oct 18;20(4):415–6. doi: 10.1016/j.ccr.2011.10.003.
- Boyce A, Doehmer J, Gooderham NJ. *Phytoalexin resveratrol attenuates the mutagenicity of the heterocyclic amines 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline*. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 802; 2004; 217–223.
- Bracken AP & Helin K. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. Nat. Rev. Cancer 2009; 9, 773–784.
- Briscoe J, Briscoe J. *Making a grade: Sonic Hedgehog signalling and the control of neural cell fate*. EMBO J. 2009; 28(5), 457–65.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A *A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE*. Mol Cell. 2000 Feb;5(2):207–16.
- Bryan EJ, Jokubaitis VJ, Chamberlain NL, Baxter SW, Dawson E, Choong DY, Campbell IG *Mutation analysis of EP300 in colon, breast and ovarian carcinomas*. Int J Cancer. 2002 Nov 10;102(2):137–41.
- Cadieux B, Ching TT, VandenBerg SR, Costello JF. *Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation*. Cancer Research 2006; 66:8469–76.
- Cadigan KM, Liu YI. *Wnt signaling: complexity at the surface*. J. Cell Sci 2006; 119, 395–402. Cancer Res. 54, 5848 (1994).
- Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. *AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD(+) metabolism and SIRT1 activity*. Nature 2009; 458:1056–1060.
- Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matak C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR, Auwerx J. *Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle*. Cell Metab. 2010; 11:213–219.

- Cao Z, Fang J, Xia C, Shi X, Jiang BH. *Trans-3,4,50- trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells*. Clin. Cancer Res. 2004; 10, 5253–5263.
- Castino R, Pucer A, Veneroni R, Morani F, Peracchio C, Lah TT, Isidoro C. *Resveratrol reduces the invasive growth and promotes the acquisition of a long-lasting differentiated phenotype in human glioblastoma cells*. J Agric Food Chem. 2011 Apr 27;59(8):4264-72.
- Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Costantino L, Poli R, Bosco O, Boccuzzi G. *Valproic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in poorly differentiated thyroid cancer cells*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005; 90:1383-1389
- Cha TL, Zhou BP, Xia W, Wu Y, Yang CC, Chen CT, Ping B, Otte AP, and Hung MC. *Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3*. Science 2005; 310, 306-310.
- Chaffanet M, Chauvin C, Lainé M, Berger F, Chédin M, Rost N, Nissou MF, Benabid AL. *EGF receptor amplification and expression in human brain tumours*. Eur J Cancer. 1992;28(1):11-7.
- Chai J, Charboneau AL, Betz BL, Weissman BE. *Loss of the hSNF5 gene concomitantly inactivates p21CIP/WAF1 and p16INK4a activity associated with replicative senescence in A204 rhabdoid tumor cells*. Cancer Res. 2005 Nov 15;65(22):10192-8.
- Chalmers AJ. *Radioresistant glioma stem cells: therapeutic obstacle or promising target?* DNA Repair 2007; 6:1391-94.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, and Smith A. *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell 2003; 113, 643-655.
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, and Diederich M. *Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid*. J Biomed Biotechnol, 2010.
- Chen CH, Chang YJ, Ku MS, Chung KT, Yang JT. *Enhancement of temozolomide-induced apoptosis by valproic acid in human glioma cell lines through redox regulation*. J Mol Med (Berl). 2011 Mar;89(3):303-15.
- Chen CY, Jang JH, Li MH, Surh YJ. *Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005; 331, 993–1000.
- Chen G, Huang LD, Jiang YM, Manji HK. *The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3*. J Neurochem. 1999 Mar;72(3):1327-30.
- Chen HJ, Hsu LS, Shia YT, Lin MW, Lin CM. *The β -catenin/TCF complex as a novel target of resveratrol in the Wnt/ β -catenin signaling pathway*. Biochem Pharmacol. 2012 Nov 1;84(9):1143-53.
- Chen JC, Chen Y, Lin JH, Wu JM, Tseng SH. *Resveratrol suppresses angiogenesis in gliomas: evaluation by color Doppler ultrasound*. Anticancer Res 2006; 26:1237–1245.
- Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, Edgar KA, Wallin JJ, Lamszus K, Westphal M, Heim S, James CD, VandenBerg SR, Costello JF, Moorefield S, Cowdrey CJ, Prados M, Phillips HS. *A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma*. Cancer Cell. 2010; 13;17(4):362-75.
- Chen T, and Li E. *Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals*. Curr Top Microbiol Immunol 2006; 301, 179-201.
- Chen W, Ren XR, Nelson CD, Barak LS, Chen JK, Beachy PA, De Sauvage F, Lefkowitz RJ. *Activity-Dependent Internalization of Smoothened Mediated by beta-Arrestin 2 and GRK2*. Science 2004; 306 (5705): 2257–60.
- Chi P, Allis CD & Wang GG. *Covalent histone modifications-miswritten, misinterpreted and miserased in human cancers*. Nat. Rev. Cancer 2010; 10, 457–469.
- Christofori G. *New signals from the invasive front*. Nature 2006;441: 444–50.
- Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, and Li BF. *Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1*. Science 1997; 277, 1996-2000.
- Cinatl J, Scholz M, Driever PH, Henrich D, Kabickova H, Vogel JU, Doerr HW, and Kornhuber B. *Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells*. Anticancer Drugs 1996; 7, 766-773.

- Cinatl JJr, Kotchetkov R, Blaheta R, Driever PH, Vogel JU, Cinatl J. *Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valproic acid: enhancement by combination with interferon- α* . *Int. J. Oncol.* 2002; 20:97-106.
- Clarke ID and Dirks PB *A human brain tumor-derived PDGFR- α deletion mutant is transforming*. *Oncogene*. 2003; 22: 722–733.
- Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S. *Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells*. *Blood* 1998; 92, 996–1002.
- Cloos PA, Christensen J, Agger K, Helin K. *Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease*. *Genes Dev.* 2008 May 1;22(9):1115-40.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. *Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase*. *Science*. 2004 Jul 16;305(5682):390-2.
- Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, and Young RA. *Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells*. *Genes and Development*, 2008; vol. 22, no. 6, pp. 746–755.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. *Cancer Res* 2005; 65:10946–51.
- Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenne WK. *Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation*. *Cancer Research* 1996; 56:2405–10.
- Cruz FD, Matushansky I. *Solid tumor differentiation therapy - is it possible?* *Oncotarget*. 2012 May;3(5):559-67.
- Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, Wu Y, He X, Powe NR, and Feinberg AP. *Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk*. *Science* 2003; 299, 1753-1755.
- Dai JM, Wang ZY, Sun DC, Lin RX, Wang SQ. *SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity*. *J Cell Physiol*. 2007 Jan;210(1):161-6.
- Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. *Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 2007; 104:10158-63.
- Datta J, Ghoshal K, Denny WA, Gamage SA, Brooke DG, Phiasivongsa P, Redkar S, Jacob ST. *A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation*. *Cancer Res.* 2009 May 15;69(10):4277-85. Epub 2009 May 5.
- De la Roche M, Worm J, Bienz M. *The function of BCL9 in Wnt/beta-catenin signaling and colorectal cancer cells*. *BMC Cancer*. 2008 Jul 15;8:199.
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R. *A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain*. *Nature*. 1999 Apr 8;398(6727):518-22.
- Delmas D, Rebe C, Lacour S, Filomenko R, Athias A, Gamber P, Cherkaoui-Malki M, Jannin B, Dubrez- Daloz L, Latruffe N, Solary E. *Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells*. *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 41482–41490.
- Delmas D, Rebe C, Micheau O, Athias A, Gamber P, Grazide S, Laurent G, Latruffe N, Solary E. *Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells*. *Oncogene* 2004; 23, 8979–8986.
- Deng CX. *SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor?* *Int J Biol Sci.* 2009;5(2):147-52. Epub 2009 Jan 21.
- Dey M, Ulasov IV, Lesniak MS. *Virotherapy against malignant glioma stem cells*. *Cancer Lett.* 2010 Mar 1;289(1):1-10. Epub 2009 Jul 29.
- Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Fareta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. *Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor*. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1079-82.
- Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, et al. *The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition*. *J Biol*

Chem 2007; 282:17259–71.

Du SJ, Purcell SM, Christian JL, McGrew LL and Moon RT. *Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in Xenopus embryos*. Mol. Cell. Biol. 1995; 15, 2625–2634.

Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA. *Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors*. Cancer Treat Rev. 2008 May;34(3):206–22. doi: 10.1016/j.ctrv.2007.11.003. Epub 2008 Jan 15.

Easwaran HP, Schermelleh L, Leonhardt H, and Cardoso MC. *Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases*. EMBO Rep 2004; 5, 1181–1186.

Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox TV, Davies R, Down TA, et al. *DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22*. Nat Genet 2006; 38, 1378–1385.

Eden A, Gaudet F, Waghmare A, and Jaenisch R. *Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation*. Science 2003; 300, 455.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature. 2004 May 27;429(6990):457–63.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB & Herman JG. *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia*. Cancer Res. 1999; 59, 793–797.

Esteller M. & Herman JG. *Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer*. Oncogene 2004; 23, 1–8.

Esteller M. *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. Nat Rev Genet 2007; 8, 286–298.

Esteller M. *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med 2008; 358, 1148–1159.

Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Talpaz M, Aggarwal BB. *Resveratrol blocks interleukin-1 β -induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells*. Blood 2003; 102, 987–995.

Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. *MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Oct 2;104(40):15805–10. Epub 2007 Sep 21.

Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li YM, and Eberhart CG. *Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors*. Cancer Res 2006; 66, 7445–7452.

Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, et al.. *A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas*. Cancer Res. 2005; 65:9328–37.

Feinberg AP, and Tycko B. *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer 2004; 4, 143–153.

Feinberg AP, Ohlsson R, and Henikoff S. *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. Nat Rev Genet 2006; 7, 21–33.

Feinberg AP. *Mendel stayed home. Genomic imprinting and environmental disease susceptibility*. Trends Genet 1999; 15, 46.

Feng Q, Zhang Y. *The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes*. Genes Dev. 2001 Apr 1;15(7):827–32.

Filippi-Chiela EC, Thomé MP, Bueno e Silva MM, Pelegrini AL, Ledur PF, Garicochea B, Zamin LL, Lenz G. *Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells*. BMC Cancer. 2013 Mar 22;13:147. doi: 10.1186/1471-2407-13-147.

Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, Bhimavarapu A, Luikenhuis S, de Cabo R, Fuchs C, et al. *The SIRT1 Deacetylase Suppresses Intestinal Tumorigenesis and Colon Cancer Growth*. PloS One 2008, 3(4), e2020.

- Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin.* 2007 Nov;25(4):867-90, vii.
- Foltz G, Yoon JG, Lee H, Ma L, Tian Q, Hood L, Madan A. *Epigenetic regulation of wnt pathway antagonists in human glioblastoma multiforme.* *Genes Cancer.* 2010 Jan;1(1):81-90.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD. *Extending healthy life span—from yeast to humans.* *Science* 2010; 328:321–326.
- Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O. *Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase.* *FEBS Lett.* 1998; 421, 277–279.
- Fraga MF. et al. *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer.* *Nature Genet.* 2005; 37, 391–400.
- Frederic L, Wang XY, Eley G, and James CD. *Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas.* *Cancer Res.* 2000; 60: 1383– 1387.
- Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, Zhou X, Jones PA. *The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2.* *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2623-9. Epub 2009 Mar 3.
- Frigola J, Song J, Stitzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, Clark SJ. *Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band.* *Nat Genet.* 2006 May;38(5):540-9. Epub 2006 Apr 23.
- Fukukawa C, Nagayama S, Tsunoda T, Toguchida J, Nakamura Y, Katagiri T. *Activation of the non-canonical Dvl-Rac1-JNK pathway by Frizzled homologue 10 in human synovial sarcoma.* *Oncogene* 2009;28: 1110–20.
- Fulda S, Debatin KM. *Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review.* *Cancer Detect. Prev.* 2006; 30, 217–223.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment.* *Genes Dev.* 2007 Nov 1;21(21):2683-710.
- Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, and Stratton MR. *A census of human cancer genes.* *Nat Rev Cancer* 2004; 4, 177-183.
- Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, Domann FE. *Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression.* *Nat Genet.* 2002 Jun;31(2):175-9. Epub 2002 May 20.
- Gagliano N, Moscheni C, Torri C, Magnani I, Bertelli AAE, Gioia M. *Effect of resveratrol on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) on human cultured glioblastoma cells.* *Biomed Pharmacother* 2005; 59:359–364.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. *Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma.* *Cancer Research* 2004; 64:7011-21.
- Garg AK, Buchholz TA, Aggarwal BB. *Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols.* *Antioxid. Redox Signal.* 2005; 7, 1630–1647.
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, and Jaenisch R. *Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation.* *Science* 2003; 300, 489-492.
- Gean PW, Huang CC, Hung CR, and Tsai JJ. *Valproic acid suppresses the synaptic response mediated by the NMDA receptors in rat amygdalar slices.* *Brain Res Bull,* 1994; 33, 333-336.
- Gilbert MR, and Lohin M. *The Treatment of Malignant Gliomas.* *Curr Treat Options Neurol* 2005; 7, 293-303.
- Giles HR, van Es JH, Clevers H. *Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer.* *Biochimica et Biophysica Acta,* 2003; 1653, 1-24.
- Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton HB, Chiocca EA, Lawler S. *Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal.* *Cancer Research* 2008; 68:9125–30.
- Goll MG, and Bestor TH. *Eukaryotic cytosine methyltransferases.* *Annu Rev Biochem* 2005; 74, 481-514.

- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, et al. *Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells*. EMBO J 20:6969-6978, 2001.
- Gotze S, Wolter M, Reifenberger G, Muller O, and Sievers S. *Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas*. International Journal of Cancer, 2010; vol. 126, no. 11, pp. 2584–2593.
- Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, and Horsthemke B. *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma*. Hum Genet 1989; 83, 155-158.
- Griffero F, Daga A, Marubbi D, Capra MC, Melotti A, Pattarozzi A, Gatti M, Bajetto A, Porcile C, Barbieri F, Favoni RE, Lo Casto M, Zona G, Spaziante R, Florio T, Corte G. *Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors*. J Biol Chem. 2009; 284:7138-48.
- Groves MD, Puduvalli VK, Chang SM, Conrad CA, Gilbert MR, Tremont-Lukats IW, Liu TJ, Peterson P, Schiff D, Cloughesy TF, et al. *A North American brain tumor consortium (NABTC 99-04) phase II trial of temozolomide plus thalidomide for recurrent glioblastoma multiforme*. J Neurooncol 2007; 81, 271-277.
- Gu J, Liu Y, Kyrtsis AP, Bondy ML. *Molecular epidemiology of primary brain tumors*. Neurotherapeutics. 2009 Jul;6(3):427-35.
- Gusman J, Malonne H, Atassi G. *A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol*, Carcinogenesis. 2001 Aug;22(8):1111-7.
- Habas R, Dawid IB. *Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier?* J Biol. 2005;4(1):2. Epub 2005 Feb 17.
- Habas R, IB Dawid & X He. *Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation*. Genes Dev, 2003; 17(2), 295-309.
- Habas R, Y Kato & X He. *Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1*. Cell, 2001; 107(7), 843-54.
- Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. *Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer*. Prostate. 2004 May 1;59(2):177-89.
- Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. *SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells*. Nat Cell Biol. 2004 Aug;6(8):731-40. Epub 2004 Jul 4.
- Hanna LA, Foreman RK, Tarasenko IA, Kessler DS, and Labosky PA. *Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo*. Genes Dev 2002; 16, 2650-2661.
- Hata K, Okano M, Lei H, and Li E. *Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice*. Development 2002; 129, 1983-1993.
- He B, Barg RN, You L, Xu Z, Reguart N, Mikami I, Batra S, Rosell R, and Jablons DM. *Wnt signaling in stem cells and non-small-cell lung cancer*. Clin Lung Cancer 2005; 7, 54-60.
- He F, Sun YE. *Glial cells more than support cells?* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2007; 39:661–65.
- He L, Hannon GJ. *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet. 2004 Jul;5(7):522-31.
- Heltweg B, Gathbonton T, Schuler AD, Posakony J, Li H, Goehle S, Kollipara R, Depinho RA, Gu Y, Simon JA, et al. *Antitumor Activity of a Small-Molecule Inhibitor of Human Silent Information Regulator 2 Enzymes*. Cancer Res. 2006, 66(8), 4368–4377.
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. *Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 2003; 100(25):15178–83.
- Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, and Nister M. *Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: Expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops*. Cancer Res. 1992; 52: 3213–3219.
- Hess JL. *Mechanisms of transformation by MLL*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2004; 14, 235-254.

- Hickey MM, Simon MC. *Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors*. Curr. Top. Dev. Biol. 2006; 76, 217–257.
- Hicklin DJ, Ellis LM. *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol. 2005 Feb 10;23(5):1011-27. Epub 2004 Dec 7.
- Holness MJ, Caton PW, Sugden MC. *Acute and long-term nutrient-led modifications of gene expression: potential role of SIRT1 as a central coordinator of short and longer-term programming of tissue function*. Nutrition 2010; 26: 491–501.
- Hope C, Planutis K, Planutiene M, Moyer MP, Johal KS, Woo J, Santoso C, Hanson JA, Holcombe RF. *Low concentrations of resveratrol inhibit Wnt signal throughput in colon-derived cells: implications for colon cancer prevention*. Mol Nutr Food Res. 2008 Jun;52 Suppl 1:S52-61. doi: 10.1002/mnfr.200700448.
- Houtkooper RH, Williams RW, Auwerx J. *Metabolic networks of longevity*. Cell 2010; 142:9–14.
- Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A. *Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice*. Oncogene 2008; 27:404–408.
- Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A. *Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice*. Oncogene 2008; 27:404–408.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. *Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan*. Nature 2003; 425:191–196.
- Hu Y, Liu J, Wang J, Liu Q. *The controversial links among calorie restriction, SIRT1, and resveratrol*. Free Radic Biol Med. 2011 Jul 15;51(2):250-6. Epub 2011 Apr 22.
- Huang H, Lin H, Zhang X, Li J. *Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF- κ B-dependent pathway*. Oncol Rep. 2012 Jun;27(6):2050-6.
- Huang, H.S., Nagane, M., Klingbeil, C.K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X.D., Huang, C.M., Gill, G.N., Wiley, H.S., and Cavenee, W.K.. *The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling*. J. Biol. Chem. 1997; 272: 2927–2935.
- Hwang JT, Kwak DW, Lin SK, Kim HM, Kim YM, Park OJ. *Resveratrol induces apoptosis in chemoresistant cancer cells via modulation of AMPK signaling pathway*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007; 1095, 441–448.
- Hwang JW, Chung SW, Sundar IK, Yao HW, Arunachalam G, McBurney MW, Rahman I. *Cigarette smoke-induced autophagy is regulated by SIRT1- PARP-1-dependent mechanism: Implication in pathogenesis of COPD*. Arch. Biochem. Biophys. 2010; 500:203–209.
- Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP. *Molecular pathogenesis of astrocytic tumours*. J Neurooncol. 2004 Nov;70(2):137-60.
- Ichiyama T, Okada K, Lipton JM, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. *Sodium valproate inhibits production of TNF- α and IL-6 and activation of NF- κ B*. Brain Res. 2000 Feb 28;857(1-2):246-51.
- Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. *Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro*. Glia 2002; 39:193–206.
- Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jorgensen H, Ellis P, Stalker J, Jackson D, Clee C, Plumb R, Rogers J, et al. *A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci*. PLoS Biol 2008; 6, e22.
- Ingham PW, McMahon AP. *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*. Genes Dev. 15, 2001; 3059–3087.
- Issa JP, Vertino PM, Wu J, Sazawal S, Celano P, Nelkin BD, Hamilton SR, and Baylin SB. *Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression*. J Natl Cancer Inst 1993; 85, 1235-1240.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. Science. 1997 Jan 10;275(5297):218-20.
- Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lançon A, Latruffe N. *Transport of resveratrol a cancer chemopreventive agent to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake*. Biochem. Pharmacol. 2004; 68, 113–118.

- Jemal Ahmedin, Siegel Rebecca, Ward Elizabeth, Brawley Otis *Cancer statistics, 2011*. CA Cancer J Clin. 2011
- Jiang C, Pugh BF. *Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics*. Nat Rev Genet. 2009 Mar;10(3):161-72.
- Jin C, Felsenfeld G. *Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z*. Genes Dev. 2007 Jun15;21(12):1519-29.
- Jin X, Jeon HY, Joo KM, Kim JK, Jin J, Kim SH, Kang BG, Beck S, Lee SJ, Kim JK, Park AK, Park WY, Choi YJ, Nam DH, Kim H. *Frizzled 4 regulates stemness and invasiveness of migrating glioma cells established by serial intracranial transplantation*. Cancer Res. 2011 Apr 15;71(8):3066-75.
- Jones PA, Baylin SB. *The epigenomics of cancer*. Cell. 2007 Feb 23;128(4):683-92.
- Jones PA, Baylin SB. *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat. Rev. Genet. 2002; 3: 415–428.
- Jones PA, Laird PW. *Cancer epigenetics comes of age*. Nat Genet. 1999 Feb;21(2):163-7.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. Nat Genet. 1998 Jun;19(2):187-91.
- Juan SH, Cheng TH, Lin HC, Chu YL, Lee WS. *Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells*. Biochem. Pharmacol. 2005; 69, 41–48.
- Juengel E, Makarević J, Tsaour I, Bartsch G, Nelson K, Haferkamp A, Blaheta RA. *Resistance after chronic application of the HDAC-inhibitor valproic acid is associated with elevated Akt activation in renal cell carcinoma in vivo*. PLoS One. 2013;8(1):e53100.
- Jung GA, Yoon JY, Moon BS, Yang DH, Kim HY, Lee SH, Bryja V, Arenas E, Choi KY. *Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK-p21Cip/WAF1 pathway*. BMC Cell Biol. 2008 Dec 9;9:66.
- Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TJ, Scott AM, Gullick WJ. *A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor*. Proc. Natl. Acad. Sci. 2003; 100: 639–644.
- Kabra N, Li Z, Chen L, Li B, Zhang X, Wang C, Yeatman T, Coppola D, Chen J. *SirT1 Is an Inhibitor of Proliferation and Tumor Formation in Colon Cancer*. J. Biol. Chem. 2009, 284(27), 18210–18217.
- Kaiser M, Zavrski I, Sterz J, Jakob C, Fleissner C, Kloetzel PM, Sezer O, Heider U. *The effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and apoptosis in multiple myeloma*. Haematologica 2006; 91:248-251.
- Kamino M, Kishida M, Kibe T et al. *Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2*. Cancer Science, 2011; vol. 102, no. 3, pp. 540–548.
- Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, and Sasaki H. *Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting*. Nature 2004; 429, 900-903.
- Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, and Kondo S. *Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells*. Cell Death Differ 2004; 11, 448-457.
- Kawagoe R, Kawagoe H, Sano K. *Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways*. Leuk. Res. 2002; 26:495-502.
- Kenyon CJ. *The genetics of ageing*. Nature 2010; 464:504–512.
- Kikuchi A. *Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signalling pathway*. Cancer Sci, March 2003; Vol 94, no 3, 225-229.
- Kim YA, Choi BT, Lee YT, Park DI, Rhee SH, Park KY, Choi YH. *Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells*. Oncol. Rep. 2004; 11, 441–446.
- Kim Y, Kim KH, Lee J, Lee YA, Kim M, Lee SJ, Park K, Yang H, Jin J, Joo KM, Lee J, Nam DH. *Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance*. Lab Invest. 2012 Mar;92(3):466-73.
- Kirschmann DA, Lininger RA, Gardner LM, Seftor EA, Odero VA, Ainsztein AM, Earnshaw WC, Wallrath LL, and Hendrix MJ. *Down-regulation of HP1Hsalpha expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer*. Cancer Res 2000; 60, 3359-3363.

- Kluiver J, Kroesen BJ, Poppema S, van den Berg A. *The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies*. Leukemia. 2006 Nov;20(11):1931-6. Epub 2006 Sep 14.
- Knüpfer MM, Pulzer F, Schindler I, Hernaiz Driever P, Knüpfer H, Keller E. *Different effects of valproic acid on proliferation and migration of malignant glioma cells in vitro*. Anticancer Res. 2001 Jan-Feb;21(1A):347-51.
- Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I. *Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2008; 294, L478–L488.
- Kojima T, Shimazui T, Hinotsu S, Joraku A, Oikawa T, Kawai K, Horie R, Suzuki H, Nagashima R, Yoshikawa K, Michiue T, Asashima M, Akaza H, Uchida K. *Decreased expression of CXXC4 promotes a malignant phenotype in renal cell carcinoma by activating Wnt signaling*. Oncogene. 2009 Jan 15;28(2):297-305.
- Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y. *Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas*. Hepatol Res. 2007 Nov;37(11):974-83. Epub 2007 Jun 20.
- Kopp P. *Resveratrol a phytoestrogen found in red wine a possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'*. Eur. J. Endocrinol. 1998; 138, 619–620.
- Kouzarides T. *Chromatin modifications and their function*. Cell 2007; 128:693–705
- Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. *Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1b and tumor necrosis factor-α genes in J774.2 macrophages*. Pharmacol. Rep. 2005; 57, 390–394.
- Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, Murone M, Züllig S, Basler K. *Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex*. Cell. 2002 Apr 5;109(1):47-60.
- Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. *Epigenetics and cancer treatment*. Eur J Pharmacol. 2009; 625:131-42.
- Krivtsov AV, Armstrong SA. *MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development*. Nat Rev Cancer. 2007 Nov;7(11):823-33.
- Kucharczak J, MJ Simmons, Y Fan & C. Ge'linas. *To be, or not to be: NF-kappaB is the ansie role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis*. Oncogene. 2003; 22: 8961– 8982.
- Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR and Moon, RT. *The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape*. Trends Genet. 2000; 16, 279-283.
- Kundu JK, Shin YK, Kim SH, Surh YJ. *Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF-kB in mouse skin by blocking IjB kinase activity*. Carcinogenesis 2006; 27, 1465–1474.
- Kundu JK, Surh YJ. *Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals*. Mutat. Res. 2005; 59, 123–146.
- Kundu JK, Surh YJ. *Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kB and AP-1 as potential targets*. Mutat. Res. 2004; 555, 65–80.
- Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, et al. *Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion*. Cancer Res 2006;66:10439–48.
- Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, and Reinberg D. *Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3*. Mol Cell 2004; 14, 183-193.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature 1994; 367:645–48.
- Lee BH, Yegnasubramanian S, Lin X, Nelson WG. *Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1*. J Biol Chem 2005; 280:40749–56.
- Lee J, Son MJ, Woolard K, Donin NM, Li A, Cheng CH, Kotliarova S, Kotliarov Y, Walling J, Ahn S, Kim M, Totonchy M, Cusack T, Ene C, Ma H, Su Q, Zenklusen JC, Zhang W, Maric D, Fine HA. *Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells*. Cancer Cell 2008; 13:69–80.

- Lefranc F, Brothi J, and Kiss R. *Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis*. J Clin Oncol 2005; 23, 2411-2422.
- Lefranc F, Facchini V, and Kiss R. *Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas*. Oncologist 2007; 12, 1395-1403.
- Leonhardt H, Page AW, Weier HU, and Bestor TH. *A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei*. Cell 1992; 71, 865-873.
- Li K, Casta A, Wang R, Lozada E, Fan W, Kane S, Ge Q, Gu W, Orren D, Luo J. *Regulation of WRN protein cellular localization and enzymatic activities by SIRT1-mediated deacetylation*. J Biol Chem. 2008 Mar 21;283(12):7590-8. Epub 2008 Jan 17.
- Li T, Fan, GX, Wang W, Yuan YK. *Resveratrol induces apoptosis, influences IL-6 and exerts immunomodulatory effect on mouse lymphocytic leukemia both in vitro and in vivo*. Int. Immunopharmacol. 2007; 7, 1221-1231.
- Liao D, Johnson RS. *Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer*. Cancer Metastasis Rev. 2007; 26, 281-290.
- Lin CJ, Lee CC, Shih YL, Lin TY, Wang SH, Lin YF, Shih CM. *Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy*. Free Radic Biol Med. 2012 Jan 15;52(2):377-91.
- Lin JC, Jeong S, Liang G, Takai D, Fatemi M, Tsai YC, Egger G, Gal-Yam EN, Jones PA. *Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island*. Cancer Cell. 2007 Nov;12(5):432-44.
- Linhart HG, Lin H, Yamada Y, Moran E, Steine EJ, Gokhale S, Lo G, Cantu E, Ehrich M, He T, et al. *Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing*. Genes Dev 2007; 21, 3110-3122.
- Liu G, Ying H, Zeng G, Wheeler CJ, Black KL, Yu JS. *HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells*. Cancer Research 2004; 64:4980-6.
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. *Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma*. Mol Cancer. 2006; 5:67.
- Liu L, Ichimura K, Pettersson EH, Collins VP. *Chromosome 7 rearrangements in glioblastomas; loci adjacent to EGFR are independently amplified*. J Neuropathol Exp Neurol. 1998 Dec;57(12):1138-45.
- Liu T, Liu PY, Tee AE, Haber M, Norris MD, Gleave ME, Marshall GM. *Over-expression of clusterin is a resistance factor to the anti-cancer effect of histone deacetylase inhibitors*. Eur J Cancer. 2009 Jul;45(10):1846-54. doi: 10.1016/j.ejca.2009.03.002. Epub 2009 Apr 1.
- Liu X, Wang L, Zhao S, Ji X, Luo Y, and Ling F. *β -Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells*. Medical Oncology, 2011; vol. 28, no. 2, pp. 608-614.
- Liu Y, Tu X, Sun et al. *Wnt/ β -Catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations*. Clinical and Experimental Medicine, 2010; pp. 1-8.
- Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. *The biology of Cancer Stem Cells*. Annual Review of Cell and Developmental Biology 2007; 23:675-99.
- Logan CY, Nusse R. *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol; 20,781-810, 2004.
- Long C, Yin B, Lu Q, Zhou X, Hu J, Yang Y, Yu F and Yuan Y. *Promoter hypermethylation of the RUNX3 gene in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Invest 2007; 25, 685-690.
- Lopez-Lazaro M. *Hypoxia-inducible factor 1 as a possible target for cancer chemoprevention*. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 2006; 15, 2332-2335.
- Lorimer IA, Wikstrand CJ, Batra SK, Bigner DD, and Pastan I. *Immunotoxins that target an oncogenic mutant epidermal growth factor receptor expressed in human tumors*. Clin. Cancer Res. 1995; 1: 859-864.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol. 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6.

- Lu C, Han HD, Mangala LS, Ali-Fehmi R, Newton CS, Ozbun L, Armaiz-Pena GN, Hu W, Stone RL, Munkarah A, Ravoori MK, Shahzad MM, Lee JW, Mora E, Langley RR, Carroll AR, Matsuo K, Spannuth WA, Schmandt R, Jennings NB, Goodman BW, Jaffe RB, Nick AM, Kim HS, Guven EO, Chen YH, Li LY, Hsu MC, Coleman RL, Calin GA, Denkbass EB, Lim JY, Lee JS, Kundra V, Birrer MJ, Hung MC, Lopez-Berestein G, Sood AK. *Regulation of tumor angiogenesis by EZH2*. *Cancer Cell*. 2010 Aug 9;18(2):185-97.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
- Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M. *A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 9;105(36):13556-61. Epub 2008 Sep 3.
- Luo J, Nikolaev AY, Imai S. *Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress*. *Cell* 2001
- Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming GL, Song H. *Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis*. *Science* 2009; 323:1074–1077.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, and Kroemer G. *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8, 741-752.
- Mani M, Carrasco DE, Zhang Y, Takada K, Gatt ME, Dutta-Simmons J, Ikeda H, Diaz-Griffero F, Pena-Cruz V, Bertagnoli M, Myeroff LL, Markowitz SD, Anderson KC, Carrasco DR. *BCL9 promotes tumor progression by conferring enhanced proliferative, metastatic, and angiogenic properties to cancer cells*. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7577-86. Epub 2009 Sep 8.
- Marks PA, Xu WS. *Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy*. *J Cell Biochem*. 2009 Jul 1;107(4):600-8.
- Martinez J, Moreno JJ. *Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production*. *Biochem. Pharmacol*. 2000; 5, 865–870.
- Mayor R, Muñoz M, Coolen MW, Custodio J, Esteller M, Clark SJ, Peinado MA. *Dynamics of bivalent chromatin domains upon drug induced reactivation and silencing in cancer cells*. *Epigenetics*. 2011 Sep 1;6(9):1138-48. doi: 10.4161/epi.6.9.16066. Epub 2011 Sep 1.
- Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liau LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhi R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS. *Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors*. *N Engl J Med*. 2005 Nov 10;353(19):2012-24.
- Mendell JT. *miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease*. *Cell*. 2008 Apr 18;133(2):217-22.
- Merle P, de la Monte S, Kim M, et al. *Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterology* 2004;127:1110–22.
- Mesdjian E, Ciesielski L, Valli M, Bruguerolle B, Jadot G, Bouyard P, and Mandel P. *Sodium valproate: kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1982; 6, 223-233.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AH, Günther T, Buettner R, Schüle R. *LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription*. *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):436-9. Epub 2005 Aug 3.
- Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, Hoffmann K, Kotchetkov R, Busse R, Nau H, Cinatl JJr. *Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo*. *Mol. Pharmacol*. 2004; 65:520-527.
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nussbaum C, Lander ES, Bernstein BE. *Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells*. *Nature* 2007; 448: 553–560.
- Miller CR, Perry A. *Glioblastoma*. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Mar;131(3):397-406.
- Miller JR. *The Wnts*. *Genome Biol*; 2001; 3,1-15.

- Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang HY, Galonek H, Israelian K, Choy W, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH. *Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes*. *Nature* 2007; 450:712–716.
- Mishima, K., Johns, T.G., Luwor, R.B., Scott, A.M., Stockert, E., Jungbluth, A.A., Ji, X.D., Suvarna, P., Voland, J.R., Old, L.J., et al. *Growth suppression of intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAb) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor*. *Cancer Res.* 2001; 61: 5349–5354.
- Mohan J, Gandhi AA, Bhavya BC, Rashmi R, Karunakaran D, Indu R, Santhoshkumar TR. *Caspase-2 triggers Bax-Bak-dependent and -independent cell death in colon cancer cells treated with resveratrol*. *J. Biol. Chem.* 2006; 281, 17599–17611.
- Moon RT, JD Brown. *Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands*. *Cell* 2002; 88, n. 6: 725-728.
- Morey L, Brenner C, Fazi F, Villa R, Gutierrez A, Buschbeck M, Nervi C, Minucci S, Fuks F, Di Croce L. *MBD3, a component of the NuRD complex, facilitates chromatin alteration and deposition of epigenetic marks*. *Mol Cell Biol.* 2008 Oct;28(19):5912-23. Epub 2008 Jul 21.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. *Science*. Mar 1997;275(5307):1787-90.
- Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, Yap D, Humphries RK, Griffith OL, Shah S, Zhu H, Kimbara M, Shashkin P, Charlot JF, Tcherpakov M, Corbett R, Tam A, Varhol R, Smailus D, Moksa M, Zhao Y, Delaney A, Qian H, Birol I, Schein J, Moore R, Holt R, Horsman DE, Connors JM, Jones S, Aparicio S, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA. *Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin*. *Nat Genet.* 2010 Feb;42(2):181-5. Epub 2010 Jan 17.
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L. *Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors*. *Cell*. 2004 Feb 20;116(4):551-63.
- Mueller MM, and Fusenig NE. *Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer*. *Nat Rev Cancer* 2004; 4, 839-849.
- Murakami A, Matsumoto K, Koshimizu K, Ohigashi H. *Effects of selected food factors with chemopreventive properties on combined lipopolysaccharide- and interferon-gamma-induced IKB degradation in RAW264.7 macrophages*. *Cancer Lett.* 2003; 195, 17–25.
- Murone M, Luoh SM, Stone D, Li W, Gurney A, Armanini M, et al. *Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused*. *Nat. Cell Biol.* 2, 2000; 310–312.
- Nabekura Y, Kamiyama S, Kitagawa S. *Effects of dietary chemopreventive phytochemicals on P-glycoprotein function*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 327, 866– 870.
- Nagane M, Coufal F, Lin H, Bogler O, Cavenee WK, and Huang HJ. *A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis*. *Cancer Res.* 1996; 56: 5079–5086.
- Nagane M, Narita Y, Mishima K, Levitzki A, Burgess AW, Cavenee WK, and Huang HJ. *Human glioblastoma xenografts overexpressing a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor sensitized to cisplatin by the AG1478 tyrosine kinase inhibitor*. *J. Neurosurg.* 2001; 95: 472– 479.
- Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME. *Molecular targets of glioma invasion*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007; 64: 458 – 78.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. *Nature*. 1998 May 28;393(6683):386-9.
- Narita Y, Nagane M, Mishima K, Huang HJ, Furnari FB, and Cavenee WK. *Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastoma*. *Cancer Res.* 2002; 62: 6764–6769.
- Nelson JW, Nusse R. *Convergence of Wnt, β -catenin and Cadherin Pathways*. *Science* 2004; 303, 1483-1487.
- Network CGAR. *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1061-8. Epub 2008 Sep 4.

- Neves MA, Dinis TC, Colombo G, Sa EML. *Combining computational and biochemical studies for a rationale on the anti-aromatase activity of natural polyphenols*. ChemMedChem 2; 2007; 1750–1762.
- Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, Jones PA. *Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine*. Cancer Res. 2002 Nov 15;62(22):6456–61.
- Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, and Smith A. *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell 1998; 95, 379–391.
- Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, and Huang HJ. *A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1994; 91: 7727–7731.
- Nosho K, Shima K, Irahara N, Kure S, Firestein R, Baba Y, Toyoda S, Chen L, Hazra A, Giovannucci EL, et al. *SIRT1 Histone Deacetylase Expression Is Associated with Microsatellite Instability and CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer*. Mod. Pathol. 2009; 22(7), 922–932.
- Nusse R. *An ancient cluster of Wnt paralogues*. Trends Genet 2001; 17, 443.
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature 2007; 445:106–10.
- O'Hagan HM, Mohammad HP, Baylin SB. *Double Strand Breaks Can Initiate Gene Silencing and SIRT1-Dependent Onset of DNA Methylation in an Exogenous Promoter CpG Island*. PLoS Genet. 2008, 4(8), e1000155.
- Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, Hartlerode A, Stegmuller J, Hafner A, Loerch P, Wright SM, Mills KD, Bonni A, Yankner BA, Scully R, Prolla TA, Alt FW, Sinclair DA. *SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging*. Cell. 2008 Nov 28;135(5):907–18.
- Ohgaki H, Kleihues P. *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathol. 2005 Jan;109(1):93–108. Epub 2005 Feb 1.
- Ohgaki H, Kleihues P. *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. The American Journal of Pathology 2007; 170:1445–53.
- Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammad HP, Chen W, Daniel VC, Yu W, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB. *A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing*. Nat Genet. 2007 Feb;39(2):237–42. Epub 2007 Jan 9.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, and Li E. *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell 1999; 99, 247–257.
- Ota H, Tokunaga E, Chang K, Hikasa M, Iijima K, Eto M, Kozaki K, Akishita M, Ouchi Y, Kaneki M, et al. *Sirt1 Inhibitor, Sirtinol, Induces Senescence-Like Growth Arrest with Attenuated Ras-MAPK Signaling in Human Cancer Cells*. Oncogene 2006, 25(2), 176–185.
- Pang-Kuo Lo and Saraswati Sukumar. *Epigenomics and breast cancer*. Pharmacogenomics. 2008 December ; 9(12): 1879–1902. doi:10.2217/14622416.9.12.1879.
- Panicker SP, Raychaudhuri B, Sharma P, Tipps R, Mazumdar T, Mal AK, Palomo JM, Vogelbaum MA, Haque SJ. *p300- and Myc-mediated regulation of glioblastoma multiforme cell differentiation*. Oncotarget. 2010 Aug;1(4):289–303.
- Papi A, Ferreri AM, Rocchi P, Guerra F, Orlandi M. *Epigenetic modifiers as anticancer drugs: effectiveness of valproic acid in neural crest-derived tumor cells*. Anticancer Res. 2010 Feb;30(2):535–40.
- Pardoll R, Clarke MF, Morrison SJ. *Applying the principles of stem- cell biology to cancer*. Nature reviews- Cancer 2003; 3:895–902.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science 2008;321:1807–12.

- Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R. *Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span*. Cell Metab. 2008; 8:157–168.
- Peck B, Chen CY, Ho KK, Di Fruscia P, Myatt SS, Coombes RC, Fuchter MJ, Hsiao CD, Lam EW. *SIRT Inhibitors Induce Cell Death and p53 Acetylation through Targeting Both SIRT1 and SIRT2*. Mol. Cancer Ther. 2010, 9(4), 844–855.
- Pereira L, Yi F, and Merrill BJ. *Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal*. Molecular and Cellular Biology, 2006;vol. 26, no. 20, pp. 7479–7491.
- Perwez Hussain S, Harris CC. *Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials*. Int. J. Cancer 2007; 121, 2373–2380.
- Phillips A, Bullock T, Plant N. *Sodium valproate induces apoptosis in the rat hepatoma cell line, FaO*. Toxicology, 2003;192:219-227.
- Picard F, Kurtev M, Chung NJ, Topark-Ngarm A, Senawong T, de Oliveira RM, Leid M, McBurney MW, Guarente L. *Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma*. Nature 2004; 429: 771–776.
- Piccirillo SG, Combi R, Cajola L, Patrizi A, Redaelli S, Bentivegna A, Baronchelli S, Maira G, Pollo B, Mangiola A, DiMeco F, Dalprà L, Vescovi AL. *Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution*. Oncogene. 2009 Apr 16;28(15):1807-11.
- Polakis P. *The many ways of Wnt in cancer*. Current Opinion in Genetics & Development, 2007;17:45–51.
- Polakis P. *The oncogenic activation of β -catenin*. Current Opinion in Genetics and Development, 1999; vol. 9, no. 1, pp. 15–21.
- Pollard JW. *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis*. Nat. Rev. Cancer 2004;4, 71–78.
- Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M, Squire JA, Smith A, Dirks P. *Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens*. Cell Stem Cell. 2009;4:568-80.
- Prendergast GC, Ziff EB. *Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region*. Science. 1991 Jan 11;251(4990):186-9.
- Preusser M, Haberler C, Hainfellner JA. *Malignant glioma: neuropathology and neurobiology*. WMW 2006; 156: 332–37.
- Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE, McGarvey KM, Kang SH, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB. *Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation*. PLoS Genet. 2006 Mar;2(3):e40.
- Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, et al. *Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:5454–9.
- Rampazzo E, Persano L, Pistollato F, Moro E, Frasson C, Porazzi P, Della Puppa A, Bresolin S, Battilana G, Indraccolo S, Te Kronnie G, Argenton F, Tiso N, Basso G. *Wnt activation promotes neuronal differentiation of glioblastoma*. Cell Death Dis. 2013 Feb 21;4:e500.
- Reagan-Shaw S, Afaq F, Aziz MH, Ahmad N. *Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin*. Oncogene 2004; 23, 5151–5160.
- Regan CM. *Therapeutic levels of sodium valproate inhibit mitotic indices in cells of neural origin*. Brain Res. 1985; 347:394-398.
- Regenerative Medicine. Department of Health and Human Services. August 2006.
- Reguart N, He B, Taron M, You L, Jablons DM, Rosell R. *The role of Wnt signaling in cancer and stem cells*. Future Oncol. 2005 Dec;1(6):787-97.
- Reifenberger G, Collins VP. *Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas*. J Mol Med (Berl). 2004 Oct;82(10):656-70.

- Reisman D, Glaros S, Thompson EA. *The SWI/SNF complex and cancer*. *Oncogene*. 2009 Apr 9;28(14):1653-68. Epub 2009 Feb 23.
- Reisman DN, Sciarrotta J, Wang W, Funkhouser WK, Weissman BE. *Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis*. *Cancer Res*. 2003 Feb 1;63(3):560-6.
- Renaud S, de Lorgeril M. *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. *Lancet*. 1992 Jun 20;339(8808):1523-6.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature* 2001; 414: 105-11.
- Rezk YA, Balulad SS, Keller RS, Bennett JA. *Use of resveratrol to improve the effectiveness of cisplatin and doxorubicin: study in human gynecologic cancer cell lines and in rodent heart*. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2006; 194, e23–e26.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. *Identification and expansion of human colon- cancer-initiating cells*. *Nature* 2007; 445:111-15.
- Ringrose L, Paro R. *Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity*. *Development* 2007; 134: 223–232.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. *Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 alpha and SIRT1*. *Nature* 2005; 434:113–118.
- Rodriguez J, Muñoz M, Vives L, Frangou CG, Groudine M, Peinado MA. *Bivalent domains enforce transcriptional memory of DNA methylated genes in cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 16;105(50):19809-14.
- Rodríguez-Paredes M, Esteller M. *Cancer epigenetics reaches mainstream oncology*. *Nat Med*. 2011 Mar;17(3):330-9.
- Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL, and Curran T. *Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice*. *Cancer Cell* 2004; 6, 229-240.
- Roos WP, Batista LF, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CF, and Kaina B. *Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine*. *Oncogene* 2007; 26, 186-197.
- Rosato RR, Almenara JA, Dai Y, and Grant S. *Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells*. *Mol Cancer Ther* 2003; 2, 1273-1284.
- Ruiz i Altaba A, Sanchez P, Dahmane N. *Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells*. *Nat. Rev. Cancer* 2, 2002; 361–372.
- Ruiz IAA. *The works of GLI and the power of hedgehog*. *Nat. Cell Biol.* , 1999; E147–E148.
- Ryu CH, Yoon WS, Park KY, Kim SM, Lim JY, Woo JS, Jeong CH, Hou Y, Jeun SS. *Valproic acid downregulates the expression of MGMT and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells*. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:987495.
- Sackellares JC, Sato S, Dreifuss FE, Penry JK. *Reduction of steady-state valproate levels by other antiepileptic drugs*. *Epilepsia*. 1981 Aug;22(4):437-41.
- Saito Y, Jones PA. *Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells*. *Cell Cycle*. 2006 Oct;5(19):2220-2.
- Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. *Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells*. *Cancer Cell*. 2006 Jun;9(6):435-43.
- Salero-Coca E, Vergara P, and Segovia J. *Intracellular increases of cAMP induce opposite effects in glutamic acid decarboxylase (GAD67) and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in C6 cells*. *Neurosci Lett*, 1995; 191, 9-12.
- Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. *Neural stem cells and the origin of gliomas*. *N Engl J Med*. 2005 Aug 25;353(8):811-22.

- Santenard A, Torres-Padilla ME. Epigenetic reprogramming in mammalian reproduction: contribution from histone variants. *Epigenetics*. 2009 Feb 16;4(2):80-4.
- Sareddy GR, Panigrahi M, Challa S, Mahadevan A, and Babu PP. Activation of Wnt/ β -catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas. *Neurochemistry International*, 2009; vol. 55, no. 5, pp. 307–317.
- Sarin S and Bernath A. *Turcot syndrome (glioma polyposis): a case report*. Southern Medical Journal, 2008; vol. 101, no. 12, pp. 1273–1274.
- Sarma K, Reinberg D. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Feb;6(2):139-49.
- Savickiene J, Borutinskaite VV, Treigyte G, Magnusson KE, and Navakauskiene R. The novel histone deacetylase inhibitor BML-210 exerts growth inhibitory, proapoptotic and differentiation stimulating effects on the human leukemia cell lines. *Eur J Pharmacol* 2006; 549, 9-18.
- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, Cedar H. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet*. 2007 Feb;39(2):232-6.
- Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res*. 1994 Dec 15;54(24):6321-4.
- Schmitz KM, Schmitt N, Hoffmann-Rohrer U, Schafer A, Grummt I, Mayer C. TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Mol Cell* 2009;33:344–353.
- Schones DE, Cui K, Cuddapah S, Roh TY, Barski A, Wang Z, Wei G, Zhao K. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*. 2008 Mar 7;132(5):887-98.
- Schulte JH, Lim S, Schramm A, Friedrichs N, Koster J, Versteeg R, Ora I, Pajtler K, Klein-Hitpass L, Kuhfittig-Kulle S, Metzger E, Schüle R, Eggert A, Buettner R, Kirfel J. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res*. 2009 Mar 1;69(5):2065-71. Epub 2009 Feb 17.
- Segovia J, Lawless GM, Tillakaratne NJ, Brenner M, and Tobin AJ. Cyclic AMP decreases the expression of a neuronal marker (GAD67) and increases the expression of an astroglial marker (GFAP) in C6 cells. *J Neurochem*, 1994; 63, 1218-1225.
- Segovia J, Vergara P, and Brenner M. Differentiation-dependent expression of transgenes in engineered astrocyte cell lines. *Neurosci Lett*, 1998; 242, 172-176.
- Sellers WR, and Loda M. The EZH2 polycomb transcriptional repressor--a marker or mover of metastatic prostate cancer? *Cancer Cell* 2002; 2, 349-350.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993 Dec 16;366(6456):704-7.
- Shankar S, Singh G, Srivastava RK. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front. Biosci*. 2007; 12, 4839–4854.
- Shen WT, Wong TS, Chung WY, Wong MG, Kebebew E, Duh QY, Clark OH. Valproic acid inhibits growth, induces apoptosis, and modulates apoptosis-regulatory and differentiation gene expression in human thyroid cancer cells. *Surgery* 2005; 138:979-984.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 2004 Dec 29;119(7):941-53.
- Shih AH, Holland EC. Notch signaling enhances nestin expression in gliomas. *Neoplasia*. 2006 Dec;8(12):1072-82.
- Shimizu H, Julius MA, Giarre M, Zheng Z, Brown AM and Kitajewski J. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ*. 1997; 8, 1349-1358.
- Shivaswamy S, Bhinge A, Zhao Y, Jones S, Hirst M, Iyer VR. Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol*. 2008 Mar 18;6(3):e65.
- Shou J, Ali-Osman F, Multani AS, Pathak S, Fedi P, Srivenugopal KS. Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene*. 2002 Jan 31;21(6):878-89.

- Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG. *miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells*. BMC Medicine 2008;6:14.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Research 2003; 63:5821–28.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature 2004; 432: 396-401.
- Smith CL, Peterson CL. *ATP-dependent chromatin remodeling*. Curr Top Dev Biol. 2005;65:115-48.
- Smith JJ, Kenney RD, Gagne DJ, Frushour BP, Ladd W, Galonek HL, Israelian K, Song J, Razvadauskaite G, Lynch AV, Carney DP, Johnson RJ, Lavu S, Elliott PJ, Lambert PD, Elliston KO, Jirousek MR, Milne JC, Boss O. *Small molecule activators of SIRT1 replicate signaling pathways triggered by calorie restriction in vivo*. BMC Syst. Biol. 2009; 3:31.
- Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H, Pastorino S, Yang M, Hoffman RM, Kesari S, Verma IM. *Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 15;108(11):4274-80.
- Soffietti R, Rudà R, Trevisan E. *New chemotherapy options for the treatment of malignant gliomas*. Anti-Cancer Drugs 2007; 18:621–32.
- Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY, Nam SW. *Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer*. APMIS. 2005 Apr;113(4):264-8.
- Stadeli R, Hoffmans R, Basler K. *Transcription under the control of nuclear Arm/β-catenin*. Curr Biol 2006; 16, R378-R385.
- Staudt LM. *Oncogenic activation of NF-kappaB*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010; 2, a000109.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med. 2005 Mar 10;352(10):987-96.
- Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, and Collins VP. *Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990; 87: 8602–8606.
- Suh N, Luyengi L, Fong HH, Kinghorn AD, Pezzuto JM. *Discovery of natural product chemopreventive agents utilizing HL-60 cell differentiation as a model*. Anticancer Res. 1995 Mar-Apr;15(2):233-9.
- Sun CY, Hu Y, Guo T, Wang HF, Zhang XP, He WJ, Tan H. *Resveratrol as a novel agent for treatment of multiple myeloma with matrix metalloproteinase inhibitory activity*. Acta Pharmacol. Sin. 2006; 27, 1447–1452.
- Suslov ON, Kukekov VG, Ignatova TN, Steindler DA. *Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 29;99(22):14506-11. Epub 2002 Oct 15.
- Suzuki MM, and Bird A. *DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics*. Nat Rev Genet 2008; 9, 465-476.
- Svotelis A, Gévry N, Gaudreau L. *Regulation of gene expression and cellular proliferation by histone H2A.Z*. Biochem Cell Biol. 2009 Feb;87(1):179-88.
- Tabu K, Sasai K, Kimura T, Wang L, Aoyanagi E, Kohsaka S, Tanino M, Nishihara H, Tanaka S. *Promoter hypomethylation regulates CD133 expression in human gliomas*. CellResearch 2008; 18:1037–46.
- Tago K, Nakamura T, Nishita M, Hyodo J, Nagai S, Murata Y, Adachi S, Ohwada S, Morishita Y, Shibuya H, Akiyama T. *Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein*. Genes Dev. 2000 Jul 15;14(14):1741-9.
- Takahashi-Yanaga F, and Sasaguri T. *The Wnt/β-Catenin Signaling Pathway as a Target in Drug Discovery*. J Pharmacol Sci. 2007; 104, 293 – 302.
- Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui D, Said JW, Whittaker S, Miyakawa I, Koeffler HP. *Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells*. Clin. Cancer Res. 2004; 10:1141-1149.

- Tanaka H, Bergstrom DA, Yao MC, and Tapscott SJ. *Widespread and nonrandom distribution of DNA palindromes in cancer cells provides a structural platform for subsequent gene amplification*. Nat Genet 2005; 37, 320-327.
- Tang FY, Chiang EP, Sun YC. *Resveratrol inhibits heregulin-b1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and cell invasion in human breast cancer cells*. J. Nutr. Biochem. 2008;19, 287–294.
- Teo JL, Kahn M. *The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators*. Adv Drug Deliv Rev. 2010 Sep 30;62(12):1149-55.
- Thompson B, Townsley F, Rosin-Arbesfeld R, Musisi H, Bienz M. *A new nuclear component of the Wnt signalling pathway*. Nat Cell Biol. 2002 May;4(5):367-73
- Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagneré AM, René-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Bertherat J. *Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors*. Cancer Res. 2005 Sep 1;65(17):7622-7.
- Tonn J-C, Westphal M, Rutka JT, Grossman SA. *Neuro-Oncology of CNS Tumors*
- Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. *Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer*. Cancer Res. 2008 Jun 1;68(11):4123-32.
- Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. *Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF- κ B in macrophages by resveratrol*. Br. J. Pharmacol. 1999; 126, 673–680.
- Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN. *CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated*. Cancer Res. 1996 Jan 1;56(1):150-3.
- Ueno K, Hiura M, Suehiro Y, et al. *Frizzled-7 as a potential therapeutic target in colorectal cancer*. Neoplasia 2008;10:697–705.
- Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M. *Stem cells and cancer; the polycomb connection*. Cell. 2004 Aug 20;118(4):409-18.
- Van Lint C, Emiliani S, Verdin E. *The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation*. Gene Expr. 1996;5(4-5):245-53.
- Van Dongen AM, VanErp MG, and Voskuyl RA. *Valproate reduces excitability by blockage of sodium and potassium conductance*. Epilepsia, 1986; 27, 177-182.
- Van Nifterik KA, Van den Berg J, Slotman BJ, Lafleur MV, Sminia P, Stalpers LJ. *Valproic acid sensitizes human glioma cells for temozolomide and γ -radiation*. J Neurooncol. 2012 Mar;107(1):61-7.
- Vanamala J, Reddivari L, Radhakrishnan S, Tarver C. *Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways*. BMC Cancer. 2010 May 26;10:238. doi: 10.1186/1471-2407-10-238.
- Vasudev K, Das S, Goswami U, Tayal G. *Pharmacokinetics of valproic acid in patients with bipolar disorder*. J Psychopharmacol. 2001 Sep;15(3):187-90.
- Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton. *hSIR2 (SIRT1) functions as NAD-dependent p53 deacetylase*. Cell 2001
- Ventura A, Jacks T. *MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way*. Cell. 2009 Feb 20;136(4):586-91.
- Vescovi AL, Galli R, Reynolds B. *Brain tumor stem cells*. Nature reviews- Cancer 2006; 6:425-36.
- Vincan E, Swain RK, Brabletz T, Steinbeisser H. *Frizzled7 dictates embryonic morphogenesis: implications for colorectal cancer progression*. Front Biosci 2007;12:4558–67.
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Wagner M, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS. *Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma*. Clin Cancer Res. 2007 Feb 15;13(4):1253-9.
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS. *Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme*. J Clin Oncol. 2007 Oct 20;25(30):4722-9.
- Waddington CH. *The epigenotype*. 1942. Int J Epidemiol. 2012 Feb;41(1):10-3. Epub 2011 Dec 20.

- Waha A, Güntner S, Huang TH, Yan PS, Arslan B, Pietsch T, Wiestler OD, Waha A. *Epigenetic silencing of the protocadherin family member PCDH-gamma-A11 in astrocytomas*. *Neoplasia* 2005; 7:193–9.
- Wakeling LA, Ions LJ, Ford D. *Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions?* *Age* 2009; 31:327–341.
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr., Walle UK. *High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans*. *Drug Metab. Dispos.* 2004; 32, 1377–1382.
- Wang B, Hasan MK, Alvarado E, Yuan H, Wu H, Chen WY. *NAMPT Overexpression in Prostate Cancer and Its Contribution to Tumor Cell Survival and Stress Response*. *Oncogene* 2011, 30(8), 907–921.
- Wang GL, Fu YC, Xu WC, Feng YQ, Fang SR, Zhou XH. *Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 380:644–649.
- Wang H, Zhou H, Zou Y, Liu Q, Guo C, Gao G, Shao C, Gong Y. *Resveratrol modulates angiogenesis through the GSK3 β / β -catenin/TCF-dependent pathway in human endothelial cells*. *Biochem Pharmacol.* 2010 Nov 1;80(9):1386–95.
- Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR, Rich JN, Sullenger BA. *Notch promotes radioresistance of glioma stem cells*. *Stem Cells.* 2010 Jan;28(1):17–28.
- Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, Sun AY. *Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils*. *Brain Res.* 2002 Dec 27;958(2):439–47.
- Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C, Kim S, Xu X, Zheng Y, Chilton B, Jia R, Zheng ZM, Appella E, Wang XW, Ried T, Deng CX. *Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice*. *Cancer Cell.* 2008 Oct 7;14(4):312–23.
- Wang RH, Zheng Y, Kim HS, Xu X, Cao L, Luhasen T, Lee MH, Xiao C, Vassilopoulos A, Chen W, Gardner K, Man YG, Hung MC, Finkel T, Deng CX. *Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis*. *Mol Cell.* 2008 Oct 10;32(1):11–20.
- Wang W, Ji P, Steffen B, Metzger R, Schneider PM, Halfter H, Schrader M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. *Alterations of lymphoid enhancer factor-1 isoform expression in solid tumors and acute leukemias*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2005 Mar;37(3):173–80.
- Wang Y, Lee KW, Chan FL, Chen S, Leung LK. *The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells*. *Toxicol. Sci.* 92; 2006; 71–77.
- Wang Y, Leung FC. *An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers*. *Bioinformatics.* 2004 May 1;20(7):1170–7. Epub 2004 Feb 5.
- Watt F, Molloy PL. *Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter*. *Genes Dev.* 1988 Sep;2(9):1136–43.
- Wechsler-Reya RJ, Scott MP. *Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog*. *Neuron* 1999; 22(1), 103–14.
- Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, et al. *Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma*. *Cancer Cell* 2002;1:279–88.
- Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW. *CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer*. *Nat Genet.* 2006 Jul;38(7):787–93. Epub 2006 Jun 25.
- Wen B, Wu H, Shinkai Y, Irizarry RA, Feinberg AP. *Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells*. *Nat. Genet.* 2009; 41:246–250.
- Wen PY, Kesari S. *Malignant gliomas in adults*. *The New England Journal of Medicine* 2008; 359(5):492–507.
- Wen PY, Yung WK, Lamborn KR, Dahia PL, Wang Y, Peng B, Abrey LE, Raizer J, Cloughesy TF, Fink K, Gilbert M, Chang S, Junck L, Schiff D, Lieberman F, Fine HA, Mehta M, Robins HI, DeAngelis LM, Groves MD, Puduvalli VK, Levin V, Conrad C, Maher EA, Aldape K, Hayes M, Letvak L, Egorin MJ, Capdeville R, Kaplan R, Murgo AJ, Stiles C, Prados MD. *Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08*. *Clin Cancer Res.* 2006 Aug 15;12(16):4899–907.

- Wenzel E, Somoza V. *Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol*. Mol Nutr Food Res 2005; 49:472–481.
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW. Epigenetic stem cell signature in cancer. Nat Genet. 2007 Feb;39(2):157-8. Epub 2006 Dec 31.
- Williams SP, Nowicki MO, Liu F, Press R, Godlewski J, Abdel-Rasoul M, Kaur B, Fernandez SA, Chiocca EA, Lawler SE. *Indirubins decrease glioma invasion by blocking migratory phenotypes in both the tumor and stromal endothelial cell compartments*. Cancer Res. 2011 Aug 15;71(16):5374-80.
- Wilson AS, Power BE, Molloy PL. *DNA hypomethylation and human diseases*. Biochim. Biophys. Acta 2007; 1775:138–162.
- Winklmeier A, Poser I, Hoek KS, Bosserhoff AK. Loss of full length CtBP1 expression enhances the invasive potential of human melanoma. BMC Cancer. 2009 Feb 12;9:52.
- Witcher M, Emerson BM. *Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary*. Mol Cell. 2009 May 15;34(3):271-84.
- Wong S, Weber JD. *Deacetylation of the retinoblastoma tumour suppressor protein by SIRT1*. Biochem J. 2007 Nov 1;407(3):451-60.
- Wu JQ, Seay M, Schulz VP, Hariharan M, Tuck D, Lian J, Du J, Shi M, Ye Z, Gerstein M, Snyder MP, Weissman S. *Tcf7 is an important regulator of the switch of self-renewal and differentiation in a multipotential hematopoietic cell line*. PLoS Genet. 2012;8(3):e1002565.
- Xu Q, Yuan X, Liu G, Black KL, Yu JS. *Hedgehog signaling regulates brain tumor-initiating cell proliferation and portends shorter survival for patients with PTEN-coexpressing glioblastomas*. Stem Cells. 2008 Dec;26(12):3018-26.
- Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. *Cell migration in tumors*. Curr Opin Cell Biol 2005;17:559–64.
- Yamaguchi TP. *Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning*. Curr Biol 2001; 11, R713-R724, 2001.
- Yang AS, Estecio MR, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Issa JP. *Comment on "Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation" and "Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation"*. Science. 2003 Nov 14;302(5648):1153; author reply 1153.
- Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I. *Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF- κ B in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2007; 292, L567–L576.
- Yang XJ. *The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases*. Nucleic Acids Res. 2004 Feb 11;32(3):959-76. Print 2004.
- Yang Z, Wang Y, Fang J et al. *Expression and aberrant promoter methylation of Wnt inhibitory factor-1 in human astrocytomas*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2010; vol. 29, p. 26.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. *Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase*. EMBO J. 2004 Jun 16;23(12):2369-80.
- Ying Y, Tao Q. *Epigenetic disruption of the WNT/beta-catenin signaling pathway in human cancers*. Epigenetics. 2009 Jul 1;4(5):307-12. Epub 2009 Jul 25.
- Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, and Hirohashi S. *Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92, 7416-7419.
- Yu H, Pan C, Zhao S, Wang Z, Zhang H, Wu W. *Resveratrol inhibits tumor necrosis factor- α -mediated matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of human hepatocellular carcinoma cells*. Biomed. Pharmacother. 2007;doi:10.1016/j.biopha.2007.09.006.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. Dev Biol. 2007 Feb 1;302(1):1-12. Epub 2006 Aug 16.
- Zhang Q, Tang X, Lu QY, Zhang ZF, Brown J, Le AD. *Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells*. Mol. Cancer Ther. 2005; 4, 1465–1474.
- Zhang X, Chen T, Zhang J, Mao Q, Li S, Xiong W, Qiu Y, Xie Q, Ge J. *Notch1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating β -catenin and NF- κ B signaling via AKT activation*. Cancer Sci. 2012 Feb;103(2):181-90.

- Zheng X, Shen G, Yang X, Liu W. *Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses*. *Cancer Res* 2007; 67:3691-7.
- Zhou H, Miki R, Eeva M, Fike FM, Seligson D, Yang L, Yoshimura A, Teitell MA, Jamieson CA, Cacalano NA. *Reciprocal regulation of SOCS 1 and SOCS3 enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme*. *Clinical Cancer Research* 2007; 13:2344–53.
- Zhou H, Shang L, Li X, Zhang X, Gao G, Guo C, Chen B, Liu Q, Gong Y, Shao C. *Resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting osteoblastic differentiation of multipotent mesenchymal cells*. *Exp Cell Res*. 2009 Oct 15;315(17):2953-62. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.07.030. Epub 2009 Aug 6.
- Zhou HB, Chen JJ, Wang WX, Cai JT, Du Q. *Anticancer activity of resveratrol on implanted human primary gastric carcinoma cells in nude mice*. *World J.Gastroenterol*. 2005; 11, 280–284.
- Zhu WG, Otterson GA. *The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells*. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2003 May;3(3):187-99.
- Zilberman D, Coleman-Derr D, Ballinger T, Henikoff S. *Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks*. *Nature*. 2008 Nov 6;456(7218):125-9. Epub 2008 Sep 24.
- Zlatanova J, Thakar A. *H2A.Z: view from the top*. *Structure*. 2008 Feb;16(2):166-79

Ringraziamenti

Giunto alla fine di questo percorso di tre anni, vorrei ringraziare tutte le persone che hanno creduto in me e che mi sono state vicine sia dal punto di vista lavorativo che nella vita privata.

Prima di tutto, un grazie di cuore è dedicato ai miei genitori per il supporto, l'affetto e la fiducia che hanno saputo donarmi.

Ringrazio la mia ragazza, Ilaria, per la passione, la comprensione e la dolcezza con cui mi è stata sempre vicina, incoraggiandomi in ogni situazione.

Ringrazio, inoltre, mia sorella Valentina e mio fratello Stefano, che sono da sempre per me dei modelli di realizzazione personale a cui aspirare, per l'aiuto nella quotidianità e la disponibilità che hanno sempre dimostrato nei miei confronti.

Un ringraziamento speciale va al mio tutor di dottorato, la Professoressa Leda Dalprà, e alla Dott.ssa Angela Bentivegna per avermi permesso di svolgere il dottorato di ricerca nel loro laboratorio, per avermi spronato a migliorarmi e a superare le mie incertezze.

Un grazie di cuore anche a tutte le persone del gruppo di Genetica Medica per l'aiuto e per il supporto ricevuti in questi anni.