

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Dottorato di ricerca in Neuroscienze



STUDIO DEI POTENZIALI EFFETTI ANTINEOPLASTICI
DEL PIOGLITAZIONE SU CELLULE STAMINALI
TUMORALI DA GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Coordinatore: Prof. Guido Cavaletti

Tutor: Dott.ssa Angela Bentivegna

Tesi di Dottorato di:

Valentina Butta

Anno accademico 2013-2014

INDICE

RIASSUNTO	3
INTRODUZIONE	6
<u>1. I TUMORI CEREBRALI</u>	7
1.1 Classificazione dei tumori cerebrali	8
1.2 Il glioblastoma multiforme	12
<u>2. CELLULE STAMINALI TUMORALI</u>	15
2.1 La teoria delle <i>cancer stem cells</i>	15
2.2 Cellule staminali tumorali cerebrali	16
<u>3. MECCANISMI DI SEGNALE NEL GBM</u>	20
3.1 <i>Pathways</i> alterati nella regolazione del ciclo cellulare delle GSCs	20
3.2 <i>Pathways</i> coinvolti nel mantenimento delle GSCs	24
<u>4. IL PATHWAY DI PPARγ</u>	26
4.1 Ruolo degli agonisti di PPAR γ nei gliomi	29
4.2 Effetti del pioglitazone nei gliomi	34
<u>5. APPROCCI TERAPEUTICI</u>	36
SCOPO	41
MATERIALI E METODI	44
1. Linee cellulari	45
2. Colture cellulari	45
3. Farmaci	47
4. MTT assay	47
5. Test del trypan blue	49
6. Allestimenti di preparati cromosomici	50
7. Analisi morfologica	51
8. Immunofluorescenza	52
9. RT-PCR	54
10. Test di invasione	58
11. Analisi statistica	59

RISULTATI	60
<u>1. VALUTAZIONE DEL POTENZIALE EFFETTO CITOTOSSICO/CITOSTATICO DEL PIOGLITAZONE</u>	62
1.1 Effetti del trattamento con PIO sull'attività metabolica e sulla vitalità cellulare	62
1.2 Effetti del pioglitazone sulla capacità proliferativa e sulla morfologia nucleare	68
<u>2. VALUTAZIONE DEL POTENZIALE EFFETTO PRO-DIFFERENZIATIVO DEL PIOGLITAZONE</u>	73
2.1 Effetti del pioglitazone sulla morfologia cellulare	73
2.2 Studio delle variazioni dei marcatori di staminalità e differenziamento indotte dal pioglitazone	78
<u>3. VALUTAZIONE DEL POTENZIALE EFFETTO DEL PIOGLITAZONE SULL'INVASIVITÀ CELLULARE</u>	83
3.1 Effetto del pioglitazone sull'invasività cellulare	83
3.2 Effetto del pioglitazone sull'espressione di geni del <i>pathway</i> di Wnt	84
<u>4. VALUTAZIONE DELLA POSSIBILE ATTIVAZIONE DI UNA VIA PPARγ-INDIPENDENTE</u>	87
4.1 Effetto del pioglitazone sull'espressione di geni del <i>pathway</i> di PPAR γ	87
4.2 Effetto dell'antagonista, in trattamento singolo e combinato con PIO, sulla vitalità cellulare	89
<u>5. VALUTAZIONE DEI POTENZIALI EFFETTI ANTINEOPLASTICI DEL TRATTAMENTO COMBINATO CON PIOGLITAZONE E ACIDO VALPROICO</u>	95
5.1 Valutazione dell'effetto del trattamento combinato sulla vitalità cellulare	95
5.2 Valutazione dell'effetto del trattamento combinato sull'indice mitotico	99
5.3 Valutazione dell'effetto del trattamento combinato sull'espressione di marcatori di staminalità e differenziamento	100
5.4 Valutazione dell'effetto del trattamento combinato sull'espressione di geni coinvolti nel <i>pathway</i> di Wnt e di PPAR γ	101
DISCUSSIONE	104
SUPPLEMENTI	120
BIBLIOGRAFIA	124

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.

Interessanti evidenze preliminari suggeriscono che pazienti diabetici con GBM, in cura con agonisti di PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) mostrano una sopravvivenza media maggiore rispetto a pazienti non diabetici ricevanti la sola terapia standard per il trattamento del GBM. Da qui nasce l'interesse di questo studio sui potenziali effetti antineoplastici di un agonista di PPAR γ , il Pioglitazone, farmaco insulino-sensibilizzante attualmente impiegato in clinica per il trattamento del diabete di tipo II, testato su sei linee di cellule staminali tumorali da GBM.

Per studiare gli effetti di questo farmaco sulle linee di GSCs in nostro possesso, sono state effettuate diverse analisi:

- I) Saggi di attività metabolica (MTT), test del trypan blue e calcolo dell'indice mitotico, per indagare l'effetto citotossico/citostatico del pioglitazone;
- II) Analisi di morfologia e immunofluorescenza per verificare eventuali effetti pro-differenziativi indotti dal pioglitazone;
- III) Valutazione del potenziale effetto del pioglitazone sull'invasività cellulare tramite test di invasione e analisi di espressione di geni appartenenti al *pathway* di Wnt in seguito a trattamento farmacologico;
- IV) Valutazione della possibile attivazione di una via PPAR γ -indipendente da parte del pioglitazone attraverso analisi di espressione di geni appartenenti al *pathway* di PPAR γ in seguito a somministrazione dell'agonista e analisi della vitalità cellulare in seguito a

somministrazione di un antagonista del *pathway*, GW9662, in combinazione con PIO;

- V) Valutazione dei potenziali effetti antineoplastici del trattamento combinato di pioglitazone e acido valproico tramite: analisi della vitalità cellulare, analisi dell'indice mitotico, valutazione dell'effetto del trattamento combinato sull'espressione di marcatori di staminalità e differenziamento, analisi di espressione dei geni appartenenti al pathway di PPAR α e WNT.

I risultati ottenuti hanno messo in luce l'elevata variabilità di risposta al trattamento farmacologico con pioglitazone nelle sei linee di GSCs in esame, confermando l'eterogeneità tipica di questo tumore. Questo studio rappresenta comunque un buon punto di partenza nell'analisi dei potenziali effetti antineoplastici del pioglitazone nell'ambito del glioblastoma; i risultati ottenuti incoraggiano infatti l'approfondimento del meccanismo d'azione di questo farmaco nell'ipotesi di una terapia mirata all'eliminazione della componente staminale di questo tumore, causa principale della resistenza alle terapie convenzionali e della recidiva frequente.

Introduzione

1. I TUMORI CEREBRALI

I tumori cerebrali maligni rappresentano circa il 2% di tutte le affezioni tumorali di natura maligna negli adulti. In età pediatrica invece questi tumori risultano al secondo posto dopo le leucemie e costituiscono il 20-40% di tutti i tipi di cancro. I tumori cerebrali sono detti primari se hanno origine dal sistema nervoso centrale e secondari se sono metastasi di tumori che si sono sviluppati primariamente in altri organi.

Il ruolo centrale del cervello e le conseguenze funzionali della perdita neuronale spiegano la severità dei tumori cerebrali. Questi tumori possono variare nella loro malignità e seppur definiti tumori benigni possono provocare gravi disturbi poiché, comprimendo diverse aree cerebrali, compromettono funzioni di importanza vitale e sono spesso letali a causa della loro tendenza alla trasformazione neoplastica.

I tumori cerebrali determinano dei segni clinici, utili per la loro stessa diagnosi. Primo, i pazienti presentano crisi epilettiche parziali o generalizzate. Secondo, l'aumento della pressione intracranica generalmente è sintomo di una rapida crescita tumorale che produce alterazioni della barriera emato-encefalica promuovendo edema vasogenico. Terzo, deficit neurologici focali progressivi rispecchiano l'area cerebrale interessata dal tumore. Infine, disfunzioni cognitive di severità variabile sono frequenti nella sindrome frontale, nella propagazione meningeale del tumore, o nel caso di infiltrazioni diffuse del cervello. Nel caso di sospetto tumore cerebrale, la MRI o *magnetic resonance imaging*, con e senza infusione di gadolinio, rappresenta il miglior metodo per definire le caratteristiche della massa (sede, dimensioni, e *contrast enhancement*) (Fig.1). Nel caso in cui la MRI non sia possibile, la scansione CT (*computed tomography*), seppur meno sensibile della MRI, risulta appropriata come primo approccio per ottenere una rapida valutazione della lesione. La spettroscopia MR invece può risultare utile nel distinguere i tumori dai processi non-neoplastici. Ad ogni modo la diagnostica per immagini non consente una diagnosi precisa del tumore che dovrà essere confermata da specifici esami istologici su campioni biotici. I dati clinici, radiologici e patologici devono quindi risultare in accordo. In caso

contrario, è obbligatorio un attento confronto multidisciplinare prima di procedere al trattamento.

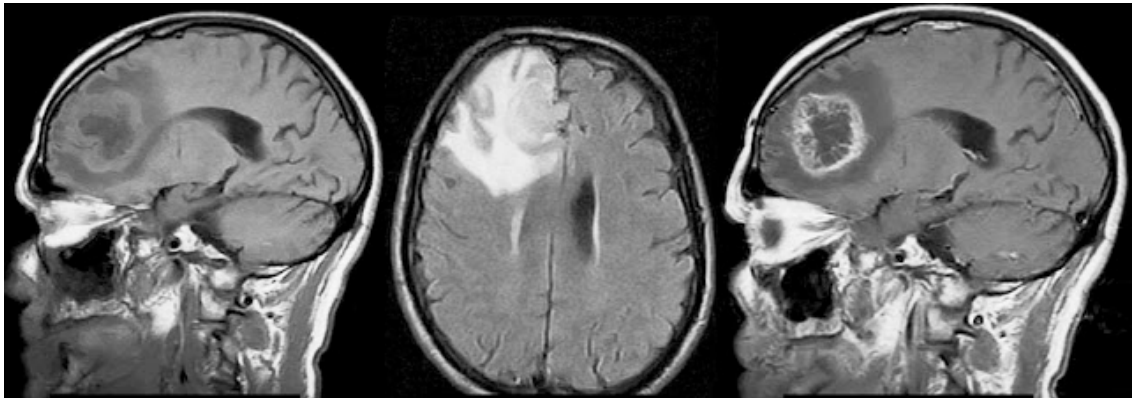


Figura 1. Immagini RM encefalo, sequenze T1 (saggittale), FLAIR (croce) e T1 Gd + (saggittale). Lesione espansiva frontale destra con morfologia arrotondata e contorni lobulati che misura circa 4 x 4 x 2.8 cm [DL DAP x DT]. Dopo la somministrazione del mezzo di contrasto, mostra enhancement ad anello eterogeneo con una zona periferica irregolare e una zona centrale ipointensa in T1 come da area necrotica. Edema perilesionale vasogenico associato ad un leggero spostamento deviazione della linea mediana. RM di un paziente con sospetto di glioblastoma multiforme.

1.1 CLASSIFICAZIONE DEI TUMORI CEREBRALI

I tumori cerebrali si distinguono in forme neoplastiche neuronali o gliali, queste ultime, definite genericamente “gliomi” sono tumori di origine neuroepiteliale che originano da cellule neurogliali che formano il tessuto di sostegno del sistema nervoso. I gliomi costituiscono circa il 78% di tutti i tumori cerebrali e sono la più comune neoplasia intracranica degli adulti. I gliomi maligni sono più frequenti negli uomini che nelle donne e due volte più rappresentati nella popolazione bianca che in quella nera. Per ragioni ancora poco chiare l’incidenza dei gliomi maligni sembra aumentare nelle persone anziane, infatti l’età media dei pazienti al momento della diagnosi è di 64 anni nel caso del glioblastoma e dei gliomi anaplastici (*CBTRUS, 2008 statistical report*). Il World Health Organization

(WHO) ha stabilito i criteri per una nuova classificazione dei gliomi in diversi istotipi in base alle loro caratteristiche istologiche e al tipo di cellula prevalente all'interno della lesione neoplastica (Sherr and McCormick 2002, Louis, Ohgaki et al. 2007) oltre a prevedere una suddivisione in quattro gradi, in base al loro grado di malignità [Tab.1] Analisi della regione più maligna del tumore consentono di stabilirne il grado in base a quattro caratteristiche principali: atipia nucleare, mitosi, proliferazione micro vascolare, e necrosi. Tra i tumori di basso grado rientrano quelli di grado I e II, mentre sono considerati di alto grado quelli di grado III e IV. Le cellule che compongono i gliomi di basso grado sono ben differenziate e mostrano delle caratteristiche istologiche simili ad astrociti e oligodendrociti. Le cellule dei gliomi di alto grado risultano anaplastiche, più simili ad astrociti immaturi, o ad oligodendrociti. Con il termine anaplasia viene descritta la progressiva trasformazione retrograda delle cellule di un tessuto, che non sono più in grado di svolgere la loro normale funzione nell'organismo. I tre principali tipi di gliomi sono astrocitomi, oligodendrocitomi e oligoastrocitomi, che possono essere solitamente distinti in base alle loro caratteristiche istologiche. 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, 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. Tra gli astrocitomi ritroviamo gli astrocitomi pilocitici (I grado), l'astrocitoma diffuso (II grado), l'astrocitoma anaplastico (III grado) e il glioblastoma (IV grado), quest'ultimo è il più anaplastico e il più frequente tra i sottotipi. Gli astrocitomi 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 neuro modulatori (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). Nessuna causa in particolare è stata identificata per la maggior parte dei gliomi maligni. L'unico fattore di rischio riconosciuto è l'esposizione a dosi terapeutiche di radiazioni ionizzanti (Fisher, Schwartzbaum et al. 2007). La possibile associazione di questi tumori a eventi traumatici, composti alimentari contenenti N-nitroso, fattori di rischio occupazionali e all'esposizione a campi elettromagnetici è risultata inconcludente. Nessuno studio ha, invece, confermato la preoccupazione riguardo all'uso di telefoni cellulari come fattore di rischio per lo sviluppo di tumori cerebrali (Inskip, Tarone et al. 2001, Lahkola, Auvinen et al. 2007). Alcune evidenze suggeriscono una possibile associazione tra fattori immunologici e gliomi. Pazienti atopici presentano un rischio ridotto di sviluppare gliomi (Linos, Raine et al. 2007), e pazienti con Glioblastoma multiforme (GBM) con elevati livelli di IgE sembrano avere un'aspettativa di vita maggiore rispetto a pazienti GBM con normali livelli di IgE (Wrensch, Wiencke et al. 2006). Svolgono un ruolo nello sviluppo dei gliomi anche polimorfismi di geni coinvolti nei meccanismi di detossificazione, di riparo del DNA, e di regolazione del ciclo cellulare (Fisher, Schwartzbaum et al. 2007). Il 5% dei pazienti presenta una predisposizione familiare per lo sviluppo di gliomi. Alcuni di questi sono associati a rare sindromi genetiche, come la neurofibromatosi di tipo 1 e 2, la sindrome di Li-Fraumeni e la sindrome di Turcot. Tuttavia per la maggior parte dei casi famigliari non è stata identificata la causa genetica.

	I	II	III	IV
Astrocytic tumours				
Subependymal giant cell astrocytoma	•			
Pilocytic astrocytoma	•			
Pilomyxoid 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	•			

Tabella1. Classificazione WHO dei tumori del sistema nervoso centrale. (Louis, Ohgaki et al. 2007).

1.2 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, Ohgaki 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, Schwartzbaum 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 (Ohgaki and Kleihues 2005, Stupp, Mason et al. 2005). Il GBM si manifesta con cefalea, nausea, sonnolenza, attacchi epilettici, deficit neurologici e disfunzioni cognitive (Bondy, Scheurer 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, Hoang-Xuan et al. 2003). Da un punto di vista clinico, il GBM si presenta in due forme distinte: il GBM primario é 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. (Ohgaki and Kleihues 2005, Furnari, Fenton et al. 2007). 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 clinicopatologiche 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%) (Reifenberger and Collins 2004, Louis, Ohgaki et al. 2007, Miller and Perry 2007). 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, Haberler 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, 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, Mason 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) (Sugawa, Ekstrand et al. 1990, Frederick, Wang et al. 2000, Furnari, Fenton et al. 2007, Wen and Kesari 2008), PDGFR (platelet-derived growth-factor receptor) (Clarke and Dirks 2003), PTEN (Ichimura, Ohgaki et al. 2004, Network 2008), TP53, MDM2, CDKN2A (Ohgaki and Kleihues 2007), e RB (Schmidt, Ichimura et al. 1994, Ueki, Ono et al. 1996, Ichimura, Ohgaki et al. 2004). I pathways alterati nei GBM primario e secondario sono fundamentalmente 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 eterozigotà a livello del 10q giochi un ruolo centrale nello sviluppo dei GBM sia primari che secondari (Ohgaki and Kleihues 2005).

2. LE CELLULE STAMINALI TUMORALI

2.1 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 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 animale immunocopromesso. Le altre cellule tumorali, che derivano dal differenziamento parziale o terminale di quelle staminali, sebbene costituiscano gran parte della massa tumorale, non sostengono la carcinogenesi e sono destinate a morire; inoltre, essendo attivamente proliferanti, possono essere eliminate dal trattamento chemioterapico (Reya, Morrison et al. 2001, Pardal, Clarke 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 differenziazione (divisione asimmetrica). Sulla base di queste analogie è stato ipotizzato che le CSCs derivino da cellule staminali normali che iperproliferano in seguito a trasformazione. 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 acquistano le caratteristiche di staminalità (Lobo,

Shimono 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. 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-) sono in grado di riprodurre il tumore in topi NOD/SCID (Lapidot, Sirard 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, Wicha et al. 2003), i principali tumori cerebrali (Hemmati, Nakano et al. 2003, Singh, Clarke et al. 2003), il melanoma (Fang, Nguyen et al. 2005), il tumore della prostata (Collins, Berry et al. 2005), il cancro del colon-retto (Dalerba, Dylla et al. 2007, O'Brien, Pollett et al. 2007, Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007) e il tumore del pancreas (Li, Fan et al. 2007).

2.2 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, quindi, 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. 2].

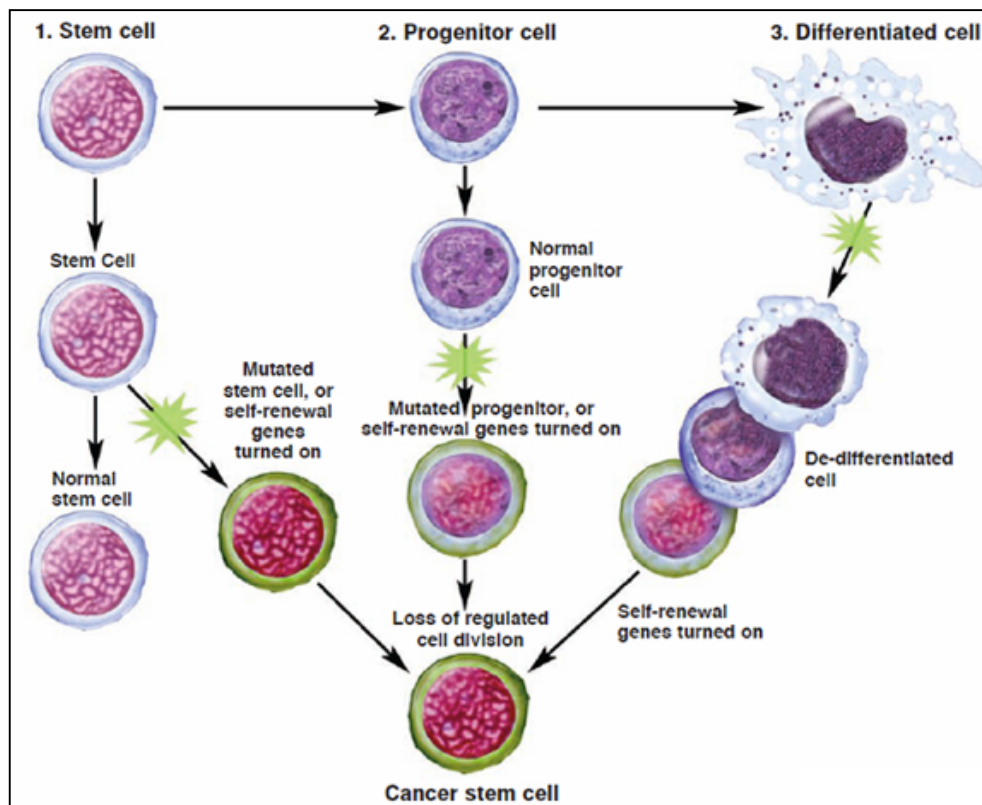


Figura 2. Rappresentazione schematica delle ipotesi sull'origine delle BTSCs

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, Hawkins et al. 2004, Vescovi, Galli 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 disaggregazione 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, Kukekov

et al. 2002, Singh, Clarke et al. 2003, Vescovi, Galli et al. 2006) [Fig.3]. 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, Nakano et al. 2003, Singh, Clarke et al. 2003).

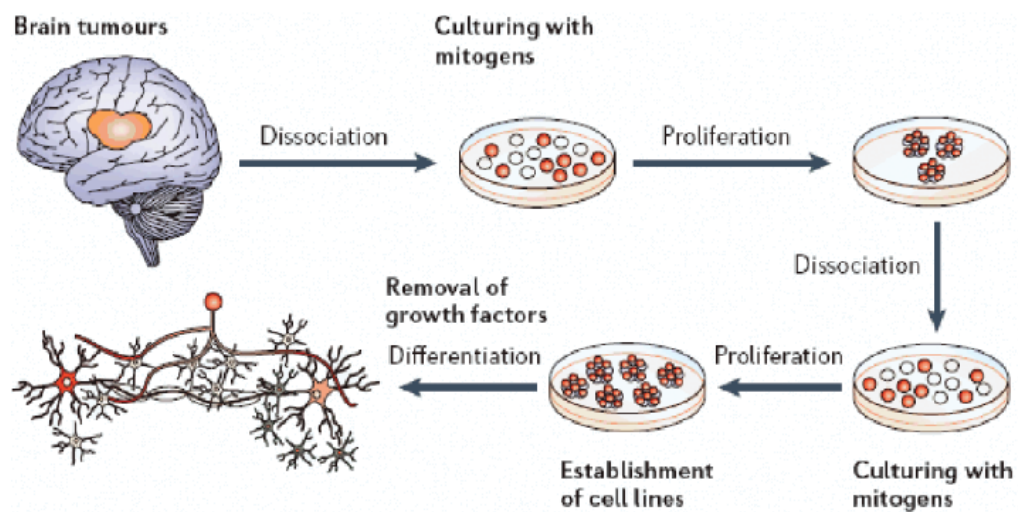


Figura 3. Neurosphere assay. Il campione tumorale viene dissociato e messo a crescere in un mezzo privo di siero in presenza di EGF e bFGF. A questo punto, solo le cellule responsive ai mitogeni, ovvero le staminali, saranno in grado di proliferare e formeranno neurosfere in sospensione. Le sfere possono essere ulteriormente disgregate e propagate nelle stesse condizioni di coltura. Rimuovendo i fattori di crescita, in presenza di siero le BTSCs vanno incontro a differenziamento (Vescovi et al., 2006).

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..

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, Binda et al. 2004, Singh, Hawkins et al. 2004, Sanai, Alvarez-Buylla et al. 2005); 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) (Suslov, Kukekov et al. 2002, Hemmati, Nakano et al. 2003, Galli, Binda et al. 2004). 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 (Ignatova, Kukekov et al. 2002). 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, Clarke 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, Clarke et al. 2003, Galli, Binda et al. 2004, Singh, Hawkins 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, Shen et al. 2007, Wang, Sengupta et al. 2008). Nello studio di Chen e colleghi 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 (Chen, Nishimura et al. 2010).

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.

3. MECCANISMI DI SEGNALE NEL GBM

Nel glioblastoma diversi tipi di alterazioni, cromosomiche genetiche e/o epigenetiche, possono interessare il DNA portando ad un'alterazione dell'omeostasi cellulare (equilibrio tra proliferazione e la morte cellulare programmata) contribuendo così al processo di trasformazione cellulare e alla tumorigenesi. Le cellule di GBM sono caratterizzate da una crescita rapida e incontrollata, anche in assenza dei fattori di crescita, e da un'aumentata resistenza all'apoptosi, meccanismi che sinergicamente portano alla formazione della massa tumorale. Le cellule più aggressive possono presentare alcune caratteristiche aggiuntive. Un'alterata capacità differenziativa, la perdita dell'inibizione da contatto e la secrezione di metalloproteasi, sono tutte caratteristiche che consentono a queste cellule l'invasione dei tessuti sani e il rilascio di fattori chimici che stimolano la formazione di nuovi vasi sanguigni, proprietà che correlano con il grado di malignità del tumore.

3.1 PATHWAYS ALTERATI NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE DELLE GSCs

I gliomi, così come gli altri tipi di tumore, sono il risultato di un'alterata espressione genica. I geni oncogeni e onco-soppressori alterati coinvolti nello sviluppo dei gliomi non sono specifici, ma le loro combinazioni risultano caratteristiche [Fig.4]. Sebbene le CSCs condividano alcune caratteristiche delle normali cellule staminali somatiche, è chiaro che tra esse esistono delle differenze

genetiche e epigenetiche che portano a una diversa regolazione dei *pathways* molecolari. Sono stati individuati una serie di *pathways* di segnalazione, le cui alterazioni sembrano associate al mantenimento del fenotipo delle GSCs. Nei gliomi, mutazioni frequenti di geni regolatori del ciclo cellulare, hanno sottolineato l'importanza di questi ultimi nella proliferazione e nell'invecchiamento cellulare. Nel GBM i *pathways* mediati da RB e p53, che regolano la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, sono quelli principalmente colpiti da mutazioni inattivanti. L'assenza di questi guardiani del ciclo cellulare rende i tumori particolarmente suscettibili a divisioni cellulari incontrollate condotte da proteine effettrici dei segnali di divisione cellulare, come le PI3K e le MAPK, la cui attività risulta così aumentata.

Il pathway di RB. Nelle cellule quiescenti, la proteina RB, nella sua forma ipofosforilata, blocca la proliferazione attraverso il sequestro di una famiglia di fattori di trascrizione, E2F, impedendo la trans-attivazione di geni essenziali per la progressione del ciclo cellulare (Sherr and McCormick 2002). Una volta attivate le CDK fosforilano RB, inattivandola, consentendo così la liberazione di E2F e la trascrizione di geni target che promuovono la progressione del ciclo cellulare nella fase S (Weinberg 1995, Frolov and Dyson 2004). I gliomi eludono la regolazione negativa del ciclo cellulare mediata da RB attraverso diverse alterazioni genetiche. Il gene Rb1 è mutato nel 25% degli astrocitomi di alto grado (Henson, Schnitker et al. 1994). Inoltre, l'amplificazione del gene CDK4 è responsabile dell'inattivazione funzionale della proteina RB nel 15% dei gliomi di alto grado, mentre CDK6 meno frequentemente può risultare amplificato (Reifenberger, Reifenberger et al. 1994, Costello, Plass et al. 1997).

Il pathway di p53. P53, regolando l'espressione di geni diversi, impedisce la propagazione di cellule che presentino un'instabilità genomica attraverso l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 o l'avvio del processo apoptotico (Vousden and Lu 2002). La perdita di p53, attraverso mutazioni puntiformi che bloccano il legame al DNA o mediante la perdita del frammento cromosomico 17p, può verificarsi frequentemente durante le fasi iniziali della progressione dei GBM secondari (Louis 1994). L'importanza di p53 nella genesi di questi tumori è sottolineata da un aumento dell'incidenza dei gliomi nei pazienti con Sindrome di Li-Fraumeni, una sindrome familiare che predispone allo sviluppo di tumori multipli, associata a

mutazioni germinali di p53 (Malkin, Li et al. 1990, Srivastava, Zou et al. 1990). Nel 10% dei GBM primari, che non presentano mutazioni per p53, la regione cromosomica 12q14-15, in cui mappa MDM2, ubiquitina ligasi di p53, risulta amplificata (Reifenberger, Reifenberger et al. 1994). Il pathway di p53 può risultare inattivato anche dall'amplificazione di MDM4 nel 4% dei GBM che non presentano nessuna mutazione di TP53 nè amplificazione di MDM2. MDM4 blocca, infatti, la trascrizione di p53 mentre promuove l'attività di MDM2 (Shvarts, Steegenga et al. 1996, Riemenschneider, Büschges et al. 1999, Linares, Hengstermann et al. 2003).

Segnalazione RTK. I gliomi possono attivare i *pathways* recettore-mediati attraverso differenti meccanismi: overespressione dei ligandi e dei rispettivi recettori, amplificazione genica e/o mutazione del recettore che può condurre a una sua attivazione costitutiva anche in assenza del ligando. I recettori tirosina chinasi o RTK mediano la trasduzione del segnale di diverse citochine oncogeniche e fattori di crescita, incluso l'epidermal growth factor (EGF) e il basic fibroblast growth factor (bFGF), utilizzati anche per il mantenimento in coltura delle GSCs (Lee, Kotliarova et al. 2006). I *pathways* mediati da EGF e dal PDGF giocano un ruolo importante sia nello sviluppo del sistema nervoso centrale che nella genesi dei gliomi. I *pathways* di trasduzione del segnale comunemente attivati da questi fattori di crescita sono quello di Ras-MAP chinasi, coinvolto nella proliferazione e nella progressione del ciclo cellulare, e il *pathway* PI3K-Akt, implicato nell'inibizione dell'apoptosi e nella proliferazione cellulare. I GBM mostrano frequentemente un'amplificazione di EGFR, che ricorre nel 40% di queste forme tumorali, e/o l'espressione di una variante costitutivamente attiva come EGFRvIII, in seguito a delezione degli esoni 2-7. Questo tipo di mutazione si ritrova nel 20-30% dei GBM e conduce ad un aumento della segnalazione EGFR-Akt (Moscatello, Holgado-Madruga et al. 1998, Choe, Horvath et al. 2003) che riduce l'apoptosi e aumenta la proliferazione delle cellule tumorali (Nishikawa, Ji et al. 1994, Narita, Nagane et al. 2002). Alla luce di ciò, non sorprende il fatto che inibitori di EGFR siano in grado di attenuare la proliferazione delle GSCs e la formazione delle neuro-sfere *in vitro* (Soeda, Inagaki et al. 2008, Griffero, Daga et al. 2009). Diversi *pathways* intracellulari sono innescati dall'attivazione di EGFR e dal PDGFR, ma il *pathway* PI3K-Akt risulta quello più fortemente legato alla biologia delle GSCs

(Dreesen and Brivanlou 2007, Eyler, Foo et al. 2008). L'azione di PI3K è direttamente antagonizzata da PTEN, un oncosoppressore che risulta inattivato nel 50% dei gliomi di alto grado (Knobbe and Reifenger 2003, Ohgaki, Dessen et al. 2004). PTEN assume un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità genomica, attraverso la stabilizzazione dei centromeri e l'induzione della riparazione del DNA. Nell' 80-90% dei GBM si evidenzia una perdita di eterozigotà (LOH) del tratto cromosomico 10q in cui mappa il gene. PTEN risulta mutato nel 20-30% degli astrocitomi di alto grado, principalmente nei GBM. La discrepanza tra le rispettive frequenze di LOH in 10q e le mutazioni di PTEN suggeriscono che altri geni onco-soppressori siano presenti in questo tratto cromosomico (Zhou, Liao et al. 2001). Sebbene il targeting della segnalazione PI3K-Akt potrebbe determinare la riduzione del potenziale tumorigenico delle GSCs, ad oggi, i risultati ottenuti dai trials clinici con inibitori di EGFR e PDGFR non sono soddisfacenti, suggerendo che l'inibizione di questi recettori non è sufficiente, da sola, a inibire la progressione tumorale. La cooperazione e la co-attivazione delle RTK rappresenta una potenziale spiegazione del fallimento dei trattamenti con inibitori dell'EGFR e del PDGFR.

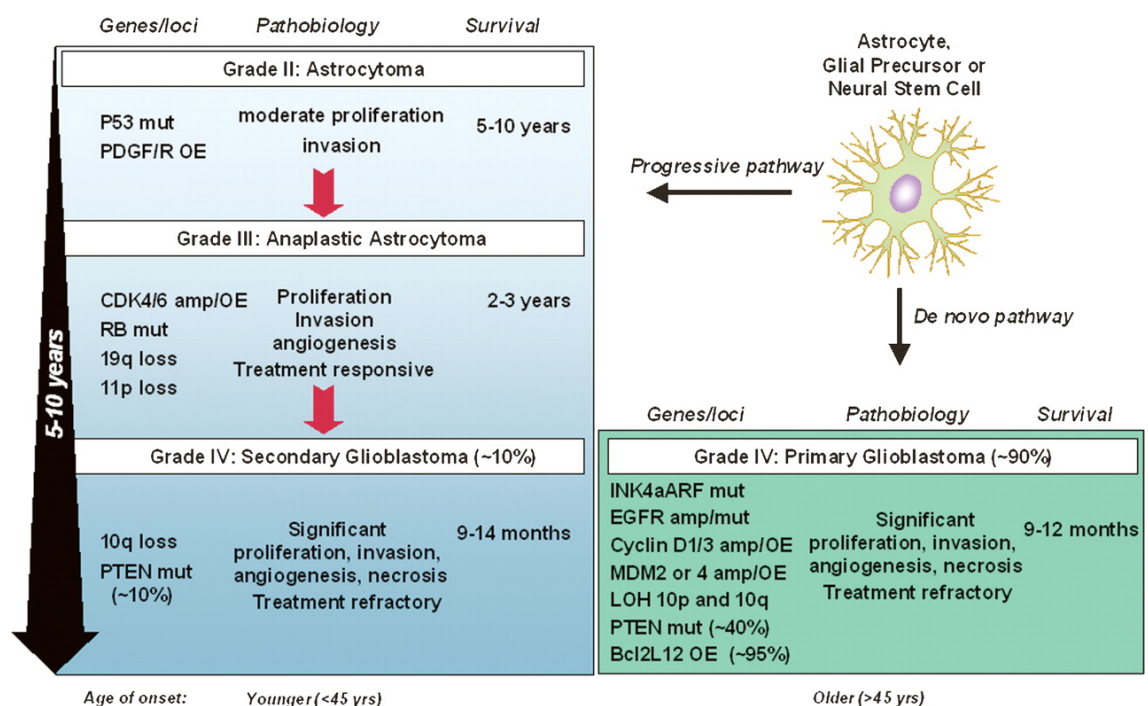


Figura 4. Aberrazioni cromosomiche e genetiche coinvolte nella genesi del glioblastoma. Sono mostrate le differenze tra sopravvivenza, patobiologia e lesioni molecolari che

portano alla formazione del glioblastoma primario (*de novo*) e secondario. (Furnari, Fenton et al. 2007).

3.2 PATHWAY COINVOLTI NEL MANTENIMENTO DELLE GSCs

Il pathway di Notch. Il *pathway* di segnalazione di Notch è un importante regolatore coinvolto nel normale sviluppo e nel mantenimento delle cellule staminali adulte, promuovendo il self-renewal e reprimendo il differenziamento (Lathia, Mattson et al. 2008). Il suo meccanismo di segnalazione è coinvolto anche nella tumorigenesi di diversi organi, incluso il cervello (Kotch et al., 2007). Il recettore Notch, i suoi ligandi, e le molecole regolate a valle sono spesso over-esprese nei gliomi (Shih and Holland 2006, Fischer and Gessler 2007, Kanamori, Kawaguchi et al. 2007). Notch è associato alla diretta attivazione trascrizionale di marcatori di staminalità, come Nestina (Shih and Holland 2006). L'inibizione della segnalazione mediata da Notch è associata a una riduzione dell'espressione dei marcatori Nestina e CD133 e della formazione di neuro-sfere (Jeon, Jin et al. 2008, Fan, Khaki et al. 2010), oltre a determinare una riduzione della crescita tumorale e a promuovere il differenziamento (Kanamori, Kawaguchi et al. 2007). La segnalazione mediata da Notch risulta anche essere associata a radioresistenza delle GSCs (Wang, Wakeman et al. 2010)(Wang et al., 2010).

Il pathway di Stat3. Il trasduttore del segnale e attivatore di trascrizione 3 (STAT3) è un regolatore trascrizionale cruciale coinvolto in una vasta gamma di attività cellulari: nello sviluppo del sistema nervoso centrale, nella risposta immunitaria, nel mantenimento delle cellule staminali e nella tumorigenesi. Il legame tra l'attivazione STAT3 e la biologia dei gliomi è diventato sempre più evidente negli ultimi anni. L'iper-attivazione di STAT3 è stata rilevata sia nei tumori solidi che ematopoietici. La funzione oncogenica di STAT3 dipende dalla sua specifica fosforilazione sul residuo Tyr-705, imputabile all'attività aberrante di diverse chinasi a monte della segnalazione. STAT3 in collaborazione con C/EBP è legata alla trasformazione mesenchimale nei GBM (Carro, Lim et al. 2010). La forma attiva e fosforilata di STAT3 nei residui in Tyr-705 e Ser-727 è presente nella popolazione delle GSCs, e questa forma attiva di STAT3 non è più rilevabile dopo induzione del differenziamento delle GSCs (Sherry, Reeves et al. 2009).

L'interleuchina-6 (IL-6), l'eritropoietina e la segnalazione Notch regolano l'attivazione di STAT3. Sembra inoltre che STAT3 contribuisca all'immunomodulazione determinata dalle GSCs, in grado di inibire la proliferazione delle cellule T (Wei, Barr et al. 2010).

Il pathway di Hedgehog. Il pathway di Hedgehog possiede un ruolo chiave per lo sviluppo del normale tessuto cerebrale e per il mantenimento di diversi tipi di cellule staminali adulte, incluse le cellule staminali neuronali (Wechsler-Reya and Scott 1999, Ahn and Joyner 2005). Esistono tre isoforme di Hedgehog nei mammiferi, ma la più studiata è Sonic Hedgehog (Martí and Bovolenta 2002). Sonic Hedgehog è il ligando che attiva il *pathway* e la sua assenza determina l'inibizione di una proteina di membrana denominata Smoothened (SMO) da parte del suo recettore Patched (PTCH), che agisce da pompa promuovendo l'efflusso di ossisteroli essenziali all'attivazione di SMO. Quando Sonic Hedgehog lega PTCH, viene inibito l'efflusso di ossisteroli promuovendo l'attivazione della proteina smoothened (SMO) che a sua volta attiva dei target a valle come i fattori trascrizionali GLI. Questi fattori di trascrizione, scoperti per la prima volta nei gliomi, dove la loro espressione risultava aumentata, sono gli attivatori Gli1 e Gli2 e il repressore Gli3 (Kinzler, Bigner et al. 1987, Shahi, Lorente et al. 2008). Una volta attivati, questi fattori di trascrizione possono traslocare al nucleo per attivare o reprimere la trascrizione dei geni da essi regolati. La segnalazione mediata da Hedgehog-Gli regola il self-renewal e il potenziale tumorigenico (Bar, Chaudhry et al. 2007, Clement, Sanchez et al. 2007, Ehtesham, Sarangi et al. 2007, Xu, Yuan et al. 2008). E' stato dimostrato, infatti, che l'attività di Gli correla con il grado tumorale in topi transgenici in cui è stato indotto lo sviluppo del glioma (Becher, Hambardzumyan et al. 2008). Pubblicazioni recenti hanno dimostrato che la proteina NANOG, uno dei geni regolati positivamente da Gli1 e Gli2, è essenziale per la crescita in vivo del GBM. NANOG potenzia la sua stessa espressione promuovendo l'attività di Gli1. Questo meccanismo, che è normalmente inibito dall'attività di p53, promuove così l'espansione del pool di cellule staminali (Zbinden et al., 2010; Po et al., 2010).

4. IL PATHWAY DI PPAR γ

Il *peroxisome proliferator-activated receptor γ* o PPAR γ rappresenta un nuovo possibile target nel trattamento dei gliomi. L'attività di PPAR γ è nota nel promuovere un'azione insulino-sensibilizzante, e per questo agonisti sintetici sono già utilizzati in clinica per il trattamento del diabete di tipo II. Oltre al suo ruolo ormai noto nel metabolismo, PPAR γ è espresso nei gliomi di alto grado, e la sua attivazione sembra avere diversi effetti antineoplastici in linee cellulari di glioma, umane e di ratto (Zander, Kraus et al. 2002, Grommes, Landreth et al. 2006).

- ***The peroxisome proliferator-activated receptor***

I *peroxisome proliferator-activated receptors* o PPARs sono fattori di trascrizione ligando-inducibili della superfamiglia dei recettori nucleari. Nei tessuti dei mammiferi sono espresse tre forme PPARs: PPAR α , PPAR δ , e PPAR γ . I PPARs controllano l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico e nell'adipogenesi, così come geni coinvolti nell'infiammazione, e nell'omeostasi metabolica. Sono principalmente recettori per grassi alimentari come l'acido oleico, linoleico, e linolenico, ma sono anche in grado di legare diversi metaboliti lipidici, prodotti dalle ciclossigenasi, come prostaglandina J2 (PGJ2), l'acido 8S-hydroxyeicosatetraenoic (8(S)-HETE) e altri fosfolipidi ossidati prodotti dalle lipossigenasi. I tre diversi sottotipi PPAR presentano diversi profili di legame agli acidi grassi. PPAR α è il più promiscuo tra le tre forme, in grado di interagire in maniera efficiente sia con gli acidi grassi saturi che insaturi. Anche PPAR δ lega sia gli acidi grassi saturi che insaturi ma con un'affinità minore rispetto a PPAR α . Al contrario PPAR γ è il più selettivo tra i sottotipi in quanto interagisce solo con un certo set di acidi grassi poli-insaturi, incluso l'acido eicosapentanoico (EPA) e l'acido arachidonico. Per quanto riguarda la loro struttura, i PPARs presentano un dominio di legame al DNA compreso tra due domini *zinc fingers* altamente conservati e un dominio di legame per il ligando all'estremità C-terminale, contenente anche il dominio di dimerizzazione e di transattivazione. Il dominio N-terminale è invece meno caratterizzato ma sembra promuovere una funzione aggiuntiva nell'attivazione trascrizionale (Kliewer, Lenhard et al. 1995).

- **PPAR α : The Glitazone Receptor**

Nei primi anni '80, gli scienziati di una compagnia farmaceutica Giapponese presentano il primo di una nuova classe di composti antidiabetici derivati dai tiazolidinedioni, chiamati *glitazoni*. Queste molecole abbassano i livelli di glucosio ematico in modelli murini insulino-resistenti senza aumentare la secrezione dell'insulina da parte del pancreas, e per questo designati come insulino-sensibilizzanti. I glitazoni originariamente sono stati derivati dal clofibrato, noto per avere una debole attività anti iperglicemica nei roditori. L'ottimizzazione dell'attività del clofibrato nell'abbassamento del glucosio ematico ha portato allo sviluppo del primo prototipo dei glitazoni, il *Ciglitazone*. In aggiunta al suo effetto antiiperglicemico, il Ciglitazone riduce anche i livelli di lipidi, inclusi trigliceridi e acidi grassi non esterificati. La successiva ottimizzazione di queste attività nei modelli animali ha condotto alla produzione di composti più potenti di questa classe chimica, tra cui il *Troglitazone*, il *Rosiglitazone* e il *Pioglitazone*. Già nei primi anni '90 è stato suggerito PPAR α come possibile recettore dei glitazoni. Diversi esperimenti sono stati condotti per verificare se i glitazoni fossero in grado di modulare l'attività di PPAR α . Essendo già chiaro il ruolo svolto da quest'ultimo nel promuovere il differenziamento degli adipociti, si è cercato di verificare se la sua attivazione da parte di agonisti sintetici potesse promuovere lo stesso risultato. Si è così dimostrato che i glitazoni aumentano notevolmente il differenziamento insulino-dipendente dei pre-adipociti e delle cellule staminali in cellule adipose (Hiragun, Sato et al. 1988, Sparks, Strauss et al. 1991). Tra i geni regolati dai glitazoni nelle cellule c'era l'*adipocyte fatty acid-binding protein* (aP2), un gene direttamente regolato dall'attività di PPAR α (Kletzien, Foellmi et al. 1992, Harris and Kletzien 1994, Tontonoz, Hu et al. 1994). Nel 1995 è stato dimostrato attraverso saggi di trasfezione che i glitazoni sono attivatori selettivi di PPAR α e che legano direttamente il recettore (Lehman, Dickerson et al. 1995). Inoltre la potenza dei glitazoni nel legame e nell'attivazione di PPAR α *in vitro* correla strettamente con la loro attività nell'abbassare i livelli di glucosio *in vivo* (Willson, Lehmann et al. 1996). Presi insieme questi risultati forniscono la chiara evidenza che PPAR α rappresenta il target molecolare dell'azione dei glitazoni.

- **Il pathway di PPAR α**

PPAR α è uno dei recettori nucleari che interagisce con derivati degli acidi grassi. PPAR α è attivato da differenti ligandi naturali, come il 15d-PGJ₂, e sintetici, appartenenti alla classe dei tiazolidinedioni. Sono stati anche individuati degli specifici antagonisti sintetici di PPAR α , GW9662 e BADGE [Fig.5]. Il legame degli agonisti, naturali e sintetici, induce nel recettore un cambiamento conformazionale che consente di modularne l'attività attraverso il rilascio di corepressori e il reclutamento di diversi cofattori e di enzimi di modificazione istonica, come CBP e EP300, istone acetil-transferasi. Così come altri membri della superfamiglia di recettori nucleari, PPAR α forma degli eterodimeri con il recettore dell'acido retinoico (RXR) per poi legarsi al DNA. L'eterodimero PPAR α /RXR lega due porzioni di una sequenza consenso AGGTCA, ripetuta e diretta con un singolo nucleotide spaziatore che prende il nome di motivo DR-1. I PPREs (*peroxisome proliferator response elements*) sono stati individuati nelle regioni di regolazione trascrizionale di numerosi geni target. Il ruolo chiave assunto da PPAR α nel differenziamento degli adipociti è stato confermato grazie alla creazione di topi knockout per PPAR α che risultano del tutto privi del tessuto adiposo (Sérandour, Avner et al. 2012).

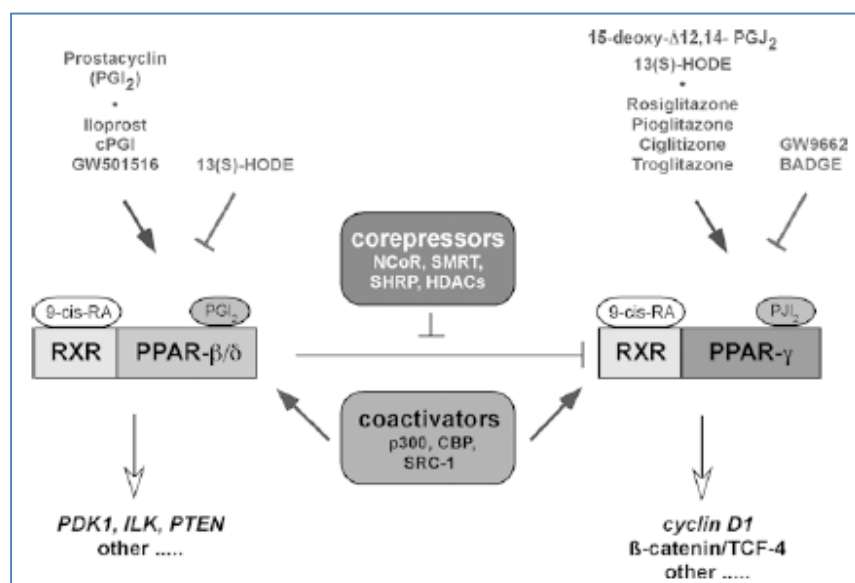


Figura 5. Interazioni di PPAR α e PPAR δ con RXR, con coattivatori e corepressori trascrizionali, e regolazione da parte di antagonisti e agonisti naturali e sintetici. (Muller, Theuer et al. 2004).

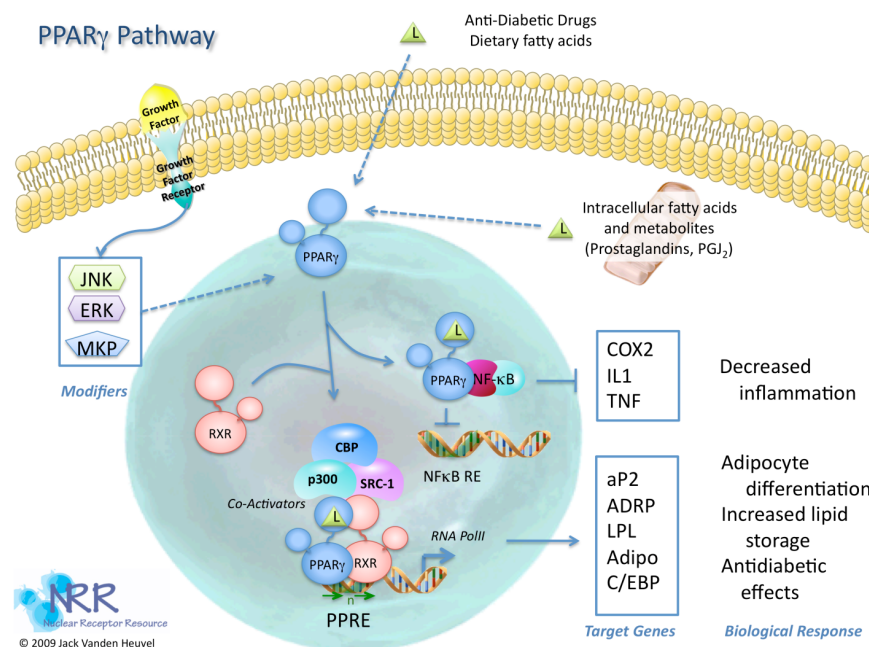


Figura 6. Il pathway di PPAR γ . (Nuclear Receptor Resource, Jack Vander Heuvel, 2009)

4.1 RUOLO DEGLI AGONISTI DI PPAR γ NEI GLIOMI

Interessanti evidenze riportate in letteratura suggeriscono che pazienti diabetici con GBM, trattati con agonisti di PPAR γ mostrano una sopravvivenza media maggiore rispetto a pazienti non diabetici ricevanti la terapia standard per il trattamento del solo GBM (Grommes, Conway et al. 2010). Si tratta di farmaci anti-diabetici, insulino-sensibilizzanti, appartenenti al gruppo dei tiazolidinedioni, efficaci per il trattamento del diabete di tipo II. Oltre alle azioni metaboliche ben definite, gli agonisti di PPAR γ presentano diversi effetti antineoplastici, inducendo la morte cellulare per apoptosi in diverse linee cellulari maligne, tra cui liposarcoma (Tontonoz, Singer et al. 1997), adenocarcinoma mammario (Mueller, Sarraf et al. 1998), carcinoma prostatico (Kubota, Koshizuka et al. 1998), carcinoma del colon-retto (Sarraf, Mueller et al. 1999), e carcinoma gastrico (Sato,

Ishihara et al. 2000). E' stato mostrato un notevole interesse sui ligandi di PPAR α come potenziali agenti terapeutici nel trattamento dei gliomi, tuttavia non sono stati ancora completamente chiariti i meccanismi molecolari, alla base della soppressione della carcinogenesi nei gliomi, determinati dall'attivazione di PPAR α .

Agonisti di PPAR α e inibizione della crescita delle BTSCs

Una delle caratteristiche più importanti dei tumori è il loro vantaggio proliferativo sui tessuti normali. Un possibile meccanismo attraverso il quale gli agonisti di PPAR α possono inibire la proliferazione cellulare è l'induzione dell'arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1, riducendo così la proporzione di cellule che entrano in fase S. In accordo con questa scoperta si osserva nelle cellule, prima della loro transizione in fase S, una diminuzione dei livelli di MYC, come pure una down-regolazione di CCND1 (cyclinD1) e delle chinasi ciclina-dipendenti associate. La riduzione della proporzione di cellule entranti in fase S, in risposta ad agonisti di PPAR α , è collegata anche ad una up-regolazione degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti CDKN1A, CDKN1B, e CDKN2B (Zang, Wächter et al. 2003, Liu, Zang et al. 2004, Wan, Shi et al. 2011). Gli agonisti di PPAR α come il Ciglitazone, 15-deossi-D12,14-prostaglandinaJ2 (15d-PGJ2) e l'Acido retinoico tutto-trans (ATRA), sono anche in grado di inibire l'espansione e la proliferazione delle BTSCs CD133+ attraverso il blocco della segnalazione JAK/STAT (Chearwae and Bright 2008, Mo, Chearwae et al. 2010). La segnalazione JAK/STAT è particolarmente importante nell'attività anti-tumorale degli agonisti di PPAR α , in quanto l'inibizione di JAK2, regolatore a monte di STAT3, determina un rallentamento della progressione del GBM nei modelli *in vivo* e *in vitro*. Gli antagonisti del *pathway* JAK / STAT agiscono sulla fosforilazione della tyr705 di STAT3 che porta a una down-regolazione di CCND1 e BCL2L1 (*B-cell-lymphomaprotein2 extralarge*), molecole che rispettivamente agiscono promuovendo l'ingresso delle cellule nel ciclo cellulare e prevenendo la morte per apoptosi (Stechishin, Luchman et al. 2013). Alti livelli di segnalazione STAT3 sono stati osservati nelle BTSCs, e l'inibizione di questa via di segnalazione ha mostrato una diminuzione della resistenza delle BTSC al Temozolomide (Villalva, Martin-Lannerée et al. 2011), che può essere utilizzato come adiuvante nel trattamento del GBM con agonisti di PPAR α . Linee cellulari di

glioma presentano un'elevata attività metabolica, che può essere significativamente aumentata dall'azione del Troglitazone. In questo modo, le cellule di glioma soffriranno maggiormente della privazione di nutrienti, un effetto che potrebbe essere mediato da un aumento della produzione dei ROS, risultando più suscettibili alla morte citotossica rispetto agli astrociti normali (Ahmad, Aykin-Burns et al. 2005, Spagnolo, Grant et al. 2007).

- ***Agonisti di PPAR α e induzione del differenziamento delle BTSCs***

Uno dei modi attraverso il quale PPAR α potrebbe contrastare le proprietà maligne che caratterizzano le BTSCs è la regolazione di geni denominati "*stemness genes*" coinvolti nel mantenimento delle proprietà staminali e del loro stato indifferenziato. Ciò può risultare importante nel trattamento dei gliomi di grado III e IV, dove le BTSCs, attraverso meccanismi come il *self renewal*, possono essere responsabili della crescita del tessuto maligno e dello sviluppo di recidive (Kanakasabai, Pestereva et al. 2012, Pestereva, Kanakasabai et al. 2012). Molti *stemness genes* sono down-regolati dall'attivazione del *pathway* di PPAR α , da parte di agonisti come il ciglitazone e il 15-PGJ2. SOX2 è uno dei *stemness genes* che risultano down-regolati. Questo gene, importante nel mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali e nella repressione del differenziamento neurale, risulta over-espresso nelle BTSCs rispetto ai tessuti normali (Schmitz, Temme et al. 2007). Da altri studi condotti sulle BTSCs di topo si osserva, a seguito del trattamento con agonisti di PPAR α , una riduzione nei loro livelli di espressione della maggior parte degli *stemness genes*, ad eccezione di NOG che risulta up-regolato (Hendrickx, Van et al. 2009). PPAR α può regolare il differenziamento delle BTSCs anche attraverso l'induzione dell'espressione di geni del differenziamento. Sempre da studi condotti su BTSCs di topo, gli agonisti di PPAR α (Ciglitazone, ATRA e 15d-PGJ2) portano ad un aumento dell'espressione di geni quali GFAP (*glial fibrillary acid protein*) e TUBB3 (BIII-tubulina), specifici per le cellule neuronali (Kanakasabai, Pestereva et al. 2012, Pestereva, Kanakasabai et al. 2012). Inoltre, in linee cellulari di glioma umane e di ratto, trattate con agonisti di PPAR α , si è osservato un aumento transitorio dell'espressione di CDH2 (N-caderina), un marcatore di differenziamento neurale, oltre ad una crescita con morfologia simile

a quella di astrociti normali (Zander, Kraus et al. 2002). Ciò suggerisce che l'attivazione del *pathway* di PPAR α può controllare il differenziamento delle cellule neurali progenitrici modulando l'espressione di geni del differenziamento neurale, così come quelli coinvolti nel mantenimento della pluripotenza (Kanakasabai, Pestereva et al. 2012, Pestereva, Kanakasabai et al. 2012).

- ***Ruolo degli agonisti di PPAR α sull'attività delle catalasi***

La catalasi è un enzima coinvolto nella neutralizzazione delle specie reattive dell'ossigeno e il suo gene contiene un elemento PPRE. Diversi studi hanno suggerito che l'effetto citotossico degli agonisti di PPAR α sulle cellule di glioma è parzialmente mediato da un aumento delle reazioni redox. *In vitro*, su cellule di ratto, l'attivazione della trascrizione mediata da PPAR α è collegata ad un aumento dell'attività della catalasi nei normali astrociti, ma non nella linea di cellule di glioma C6. L'effetto può essere abolito trasfettando le cellule con un costrutto dominante negativo per PPAR α (Khoo, Hebbar et al. 2013). L'attività delle catalasi potrebbe essere dunque indotta da agonisti di PPAR α per proteggere i normali astrociti dalle specie reattive dell'ossigeno prodotte dalle radiazioni; ciò renderebbe i trattamenti radioterapici più selettivi nel colpire la popolazione delle cellule tumorali.

- ***Il ruolo della nicchia nella progressione tumorale e l'attività degli agonisti di PPAR α***

Una delle principali caratteristiche delle cellule staminali è la capacità di auto-rinnovarsi e differenziarsi in diversi tipi cellulari; queste caratteristiche sono strettamente regolate dal microambiente o “nicchia” (Wurmser, Palmer et al. 2004, Moore and Lemischka 2006). Una nicchia di cellule staminali è un'unità strutturale interattiva, organizzata per regolare il destino cellulare in maniera appropriata. Nel cervello degli adulti le NSCs risultano concentrate intorno ai vasi sanguigni, dove qui risultano accessibili ai nutrienti e ai diversi segnali molecolari, mentre utilizzano i vasi neoformati per la loro stessa migrazione (Palmer, Willhoite et al. 2000). Similmente, le GSCs possono comporre la “nicchia vascolare”. Questa, regola strettamente la fornitura di ossigeno e nutrienti, e allo stesso tempo l'auto-rinnovamento e il differenziamento cellulare (Gilbertson and Rich 2007, Jandial, U

et al. 2008). Ad ogni modo, l'esistenza delle CSCs e della nicchia vascolare può avere un ruolo nella progressione tumorale. Esiste una reciproca interazione tra le CSCs e la nicchia vascolare. I) La vascolarizzazione tumorale genera uno specifico microambiente di nicchia che promuove la formazione e il mantenimento delle BTSCs (Calabrese, Poppleton et al. 2007). Infatti, è stato dimostrato come cellule non-tumorigeniche possano acquisire delle proprietà tumorigeniche in presenza di un microambiente appropriato (Rosen and Jordan 2009). II) Le CSCs sono in grado di modulare il microambiente della nicchia attraverso la secrezione di VEGF (Bao, Wu et al. 2006). Nelle GSCs, una condizione ipossica induce l'espressione di VEGF, attraverso un aumento dei livelli di HIF1- α e anche di HIF2- α , che non risulta espresso nei normali progenitori staminali neuronali (Li, Bao et al. 2009)(Li et al., 2009). Inoltre, l'ipossia sembrerebbe favorire l'espansione della frazione di GSCs e promuovere l'espressione di marcatori di staminalità. Ciò suggerisce una certa plasticità dello stato delle CSCs (Heddlestone, Li et al. 2009, McCord, Jamal et al. 2009, Soeda, Park et al. 2009). In questo modo, l'ipossia è in grado di promuovere la progressione tumorale e la resistenza terapeutica anche attraverso l'induzione di un fenotipo staminale tumorale. E' stato inoltre dimostrato che la presenza di cellule endoteliali vascolari promuove l'espansione delle neuro-sfere *in vitro*, e la crescita tumorale *in vivo*. Le cellule endoteliali inoltre proteggono le CSCs dai potenziali danni che possono essere indotti dalle radiazioni oltre a contribuire ad un'aumentata chemio-resistenza (Dick et al., 2005). I benefici terapeutici di una combinazione tra terapie anti-angiogeniche e chemioterapici convenzionali, potrebbero essere attribuiti al miglioramento del *drug delivery* a seguito di un miglioramento del flusso vascolare, ad un miglioramento della penetrazione del farmaco chemioterapico nel tumore come risultato della ridotta pressione interstiziale, e/o al miglioramento della risposta radio/chemioterapia dovuta a una riduzione dell'ipossia tumorale. L'attività degli agonisti di PPAR- α è coinvolta anche nell'inibizione dell'espressione del VEGF da parte delle cellule tumorali (Panigrahy, Singer et al. 2002) oltre a inibire l'espressione dei geni del recettore VEGF Flt-1 e Flk-1 da parte delle cellule endoteliali (Xin, Yang et al. 1999). Questa azione insieme alla riduzione dell'attività delle MMP e ad un induzione degli inibitori della MMP (Panigrahy, Singer et al. 2002, Sunami, Tsuno et al. 2002),

suggerisce un ruolo di PPAR- α nel regolare negativamente lo sviluppo di metastasi tumorali, oltre a regolare il microambiente tumorale.

4.2 EFFETTI DEL PIOGLITAZONE NEI GLIOMI

Tra gli agonisti di PPAR α troviamo il Pioglitazone, uno degli appartenenti al gruppo dei tiazolidinedioni. L'azione insulino-sensibilizzante del Pioglitazone, così come quella di tutti i tiazolidinedioni, è determinata dall'attivazione dei recettori PPAR α , particolarmente numerosi nel tessuto adiposo, ma espresso anche nelle cellule α del pancreas, nell'endotelio vasale e nei macrofagi. Il recettore PPAR α è implicato nella regolazione della trascrizione di alcuni geni coinvolti nella regolazione del metabolismo lipidico e nel differenziamento degli adipociti. Dunque l'effetto del Pioglitazone consiste nel migliorare la sensibilità all'insulina del tessuto adiposo, del muscolo e del fegato, promuovendo l'utilizzo del glucosio da parte di questi tessuti. Il suo attuale impiego in clinica nel trattamento del diabete di tipo II e il suo effetto antineoplastico in studi su altri tipi di cellule tumorali, insieme alla sua capacità di superare la barriera emato-encefalica (Grommes, Karlo et al. 2013), hanno suggerito il suo possibile impiego nel trattamento dei gliomi.

Una delle caratteristiche tipiche dei gliomi, soprattutto di quelli ad alto grado, consiste nella loro elevata capacità invasiva. Sono stati identificati diversi geni coinvolti nell'invasività dei gliomi, tra cui i geni delle metalloproteasi (MMP) ed dei loro inibitori tissutali endogeni (TIMP). L'espressione di MMP-2 e, in minor misura, di MMP-9 correlano con l'invasività, la proliferazione e la prognosi negli astrocitomi (Wang, Wang et al. 2003). L'espressione di MMP-2 e MMP-9 è stata monitorata, attraverso saggi di immunoistochimica, prima e dopo la somministrazione di Pioglitazone; sia MMP-2 che MMP-9 risultato indipendentemente down-regolati dopo il trattamento con Pioglitazone, suggerendo il ruolo di questo agonista di PPAR α nella riduzione dell'invasività delle cellule di glioma (Grommes, Landreth et al. 2006, Papi, Tatenhorst et al. 2009, Wan, Shi et al. 2011).

Un altro importante aspetto su cui puntano le attuali strategie terapeutiche è l'induzione del differenziamento nelle GSCs col fine di eliminare questa popolazione cellulare. L'espressione di marcatori di differenziamento, come il CS-56 (un marcatore di differenziamento astrocitico) è stato ritrovato aumentato in seguito a trattamento con Pioglitazone sia *in vivo* che *in vitro* in cellule di glioma (Grommes, Landreth et al. 2006); l'induzione del differenziamento implica lo sviluppo di un fenotipo cellulare meno invasivo. Altri studi hanno messo in luce la capacità del pioglitazone nel ridurre l'espressione di CTNNB1 (β -catenina) senza modificarne la localizzazione cellulare. CTNNB1 controlla i livelli di espressione di CDH1 (E-caderina), molecola di superficie importante nel mediare i contatti cellula-cellula. La β -catenina risulta spesso over-espressa nei gliomi di alto grado rispetto a quelli di basso grado o al tessuto normale (Li, Sorenson et al. 2011). Questo è un possibile meccanismo attraverso il quale il Pioglitazone potrebbe agire, inibendo la perdita dei contatti cellulari, oltre a ridurre la trascrizione di geni controllati da CTNNB1 come CCND1 e MYC, i cui aumentati livelli di espressione svolgono un ruolo centrale nella proliferazione tumorale (Wang, Wakeman et al. 2010).

Un'altra caratteristica distintiva delle cellule dei gliomi maligni è la spiccata resistenza a stimoli che ne inducono la morte cellulare come la radio e la chemioterapia. Questa caratteristica biologica è stata associata ad alterazioni genetiche che interessano le principali molecole regolatrici coinvolte nella segnalazione mitogenica, principalmente le RTK e l'asse di segnalazione PI3K-PTEN-Akt, così come molecole regolatrici ed effettrici delle vie classiche di morte cellulare estrinseca (morte recettore mediata) e intrinseca (mitocondri-dipendente). Una delle risposte meglio comprese delle cellule di glioma all'azione degli agonisti di PPAR α è la riduzione della vitalità cellulare dovuta a morte per apoptosi. Molti lavori, su modelli animali, hanno dimostrato che il trattamento con Pioglitazone e altri TZDs possono provocare l'apoptosi specifica delle cellule di glioma, in maniera dose-dipendente, risparmiando gli astrociti primari normali (Grommes, Landreth et al. 2006), in quanto questi ultimi sembrano esprimere livelli più bassi di PPAR α (Cullingford, Bhakoo et al. 1998, Zander, Kraus et al. 2002). Questo effetto potrebbe essere mediato da meccanismi BAX-dipendenti, in quanto a seguito dell'attivazione di PPAR α , l'up-regolazione di BAX è spesso

rilevata attraverso un aumento dei suoi livelli proteici sia su linee cellulari umane che di ratto (Zander, Kraus et al. 2002, Zang, Wächter et al. 2003, Liu, Zang et al. 2004, Spagnolo, Grant et al. 2007). Al contrario la trasfezione di queste stesse cellule con oligonucleotidi antisenso per BAX annulla l'effetto degli agonisti di PPAR γ (Zander, Kraus et al. 2002). Infine i livelli di espressione di una proteina anti-apoptotica come BCL2 risultano ridotti dopo somministrazione di Pioglitazone (Zang, Wächter et al. 2003, Liu, Zang et al. 2004).

La crescita tumorale potrebbe diminuire come risultato di una ridotta proliferazione, così come osservato da studi *in vitro* su linee cellulari di ratto. La Ki-67 è una proteina nucleare espressa in cellule proliferanti utilizzata anche come importante marcatore neuropatologico nei gliomi umani. Negli astrocitomi, l'espressione di Ki-67 è up-regolata e correla con il grado del tumore e la prognosi clinica (Parkins et al, 1991; Brown e Gatter, 2002). Il trattamento con Pioglitazone riduce l'espressione di Ki-67 *in vitro*. Pertanto, il Pioglitazone riduce sia la vitalità che la proliferazione cellulare, portando ad una diminuzione del numero di cellule tumorali *in vitro* (Grommes, Landreth et al. 2006).

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, Brotchi 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, Puduvalli 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, Germano 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, Facchini et al. 2007, Roos, Batista 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, Batista 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, Zalckvar 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 (O6-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, Rudà 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 (Eller, Longo et al. 2005). Ad oggi solo una piccola percentuale di pazienti ha mostrato benefici derivanti da tali trattamenti (Mellinghoff, Wang et al. 2005, Wen, Kesari 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, Desjardins et al. 2007, Vredenburgh, Desjardins et al. 2007). 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.7]. 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, Wu et al. 2006, Chalmers 2007) e all'iper-espressione di geni antiapoptotici (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, Yuan et al. 2006). La completa eradicazione delle CSCs risulta, quindi, essenziale ai fini di una remissione a lungo termine dopo il trattamento. La deplezione della componente staminale del tumore può essere ottenuta bloccando il signaling del self-renewal, utilizzando, ad esempio, anticorpi diretti contro Wnt (He, Reguart et al. 2005), inibitori della γ -secretasi, mirati ad antagonizzare il pathway di Notch (Fan, Matsui et al. 2006), e small molecule inhibitors, specifici per il recettore o il co-recettore di Hedgehog (Romer, Kimura et al. 2004).

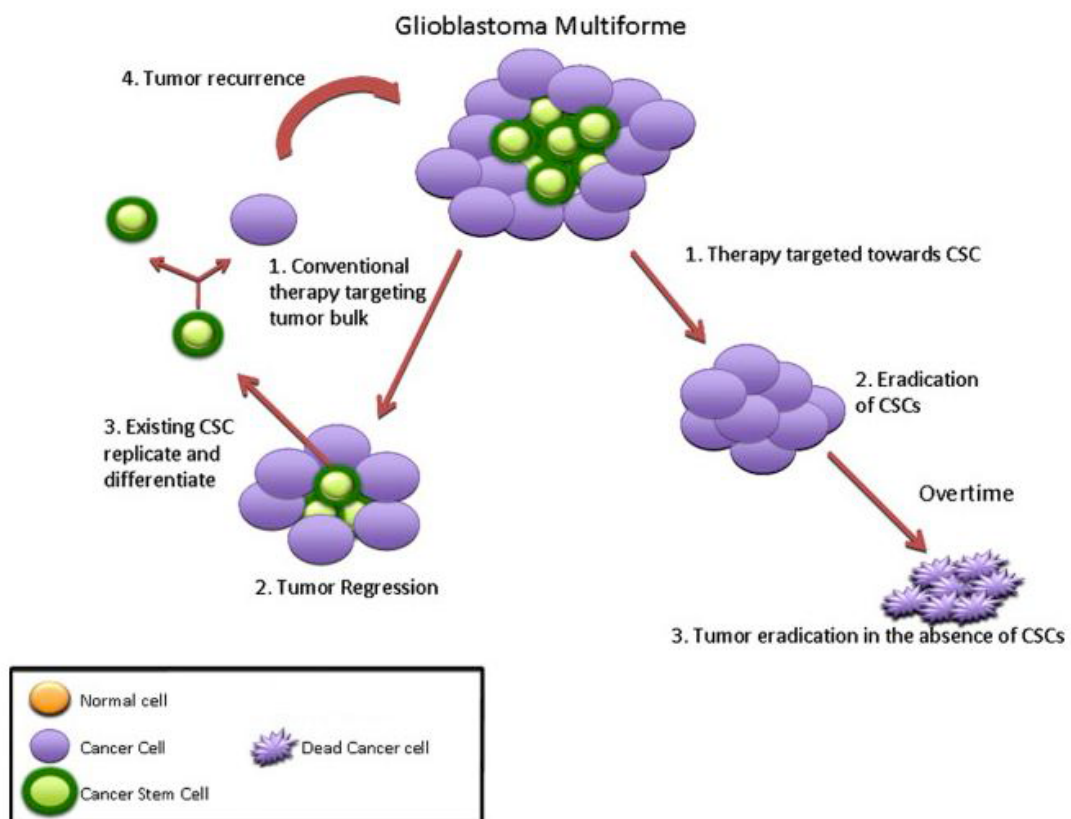


Figura 7. Le CSCs determinano la recidiva dopo l'apparente successo della terapia convenzionale. Per questo ad oggi sono oggetto di studio terapie in grado di eradicare le CSCs. (Dey, Ulasov et al. 2010).

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, Scholz 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.

Interessanti evidenze preliminari suggeriscono che pazienti diabetici con GBM, in cura con agonisti di PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) mostrano una sopravvivenza media maggiore rispetto a pazienti non diabetici riceventi la sola terapia standard per il trattamento del GBM. Lo scopo di questo studio è quindi stato quello di valutare il potenziale effetto antineoplastico del trattamento con un agonista del *pathway* di PPAR γ , il pioglitazone, su sei linee di cellule staminali tumorali da GBM in nostro possesso.

A tal fine sono state indagate l'attività metabolica, tramite MTT assay, la vitalità tramite test del trypan blue e l'indice mitotico dopo somministrazione di pioglitazone. Successivamente, è stato eseguito uno studio morfologico e un'analisi di immunofluorescenza, verificando l'espressione di marcatori specifici di staminalità e differenziamento neurale, per valutare un potenziale effetto differenziativo del farmaco. Un'altra caratteristica importante del GBM è la sua aggressività e invasività, per questo motivo è stata valutata la capacità invasiva delle linee in esame tramite test di invasione e analisi di espressione dei geni appartenenti al *pathway* di Wnt in seguito a trattamento con pioglitazone. Inoltre è stata indagata la possibile attivazione di una via PPAR γ -indipendente da parte del pioglitazone attraverso analisi di espressione di geni appartenenti al *pathway* di PPAR γ in seguito a somministrazione dell'agonista e analisi della vitalità cellulare in seguito a somministrazione di un antagonista del *pathway*, GW9662, in combinazione con PIO.

In un lavoro pregresso svolto nel nostro laboratorio è stato indagato il potenziale effetto pro-differenziativo dell'acido valproico (VPA), un inibitore delle istone deacetilasi, nelle linee di cellule staminali tumorali da GBM in nostro possesso; lo

studio ha portato ad importanti risultati che hanno messo in luce le potenzialità di questo farmaco per un eventuale utilizzo in una “terapia epigenetica” del GBM (Riva, Baronchelli et al. 2014). Questo studio è stato uno dei motivi che ci ha spinto a testare, nelle sei linee di GSCs in esame, il trattamento combinato di pioglitazone e acido valproico; un altro aspetto che ha giocato un ruolo importante nella scelta dello studio degli effetti di questo trattamento combinato, è dato da due lavori riportati in letteratura: uno dimostra come un ligando naturale di PPAR α in combinazione con VPA agiscano sinergicamente inducendo l'apoptosi di cellule di tumore del colon (Koyama, Izutani et al. 2010); il secondo mette in luce la capacità del pioglitazone di potenziare gli effetti del VPA in cellule di mieloma multiplo (Aouali, Palissot et al. 2009).

A partire da tutte queste evidenze è stato valutato l'effetto del trattamento combinato, PIO+VPA su: vitalità cellulare, indice mitotico, espressione di marcatori di staminalità e differenziamento e sull'espressione dei geni appartenenti al pathway di PPAR α e WNT, così come è stato fatto per il trattamento singolo.

Tutte queste analisi rappresentano un punto di partenza per la valutazione dei potenziali effetti antineoplastici del pioglitazone sulle linee di GSCs in esame al fine di identificare una possibile strategia terapeutica per la cura del GBM.

Materiali e Metodi

1. LINEE CELLULARI

Presso il laboratorio di Genetica Medica del dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale dell'Università Bicocca, sono state analizzate sei linee (GBM2, GBM04, G144, G166, G179 e GliNS2) di cellule staminali tumorali da 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. 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 delle cellule staminali neurali, costituito da DMEM/F-12 e Neurobasal in rapporto 1:1 (*Invitrogen*).

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' dimostrato, infatti, che entrambi questi fattori di crescita *in vitro* hanno un effetto mitogeno su precursori di tipo nervoso.

Al terreno di coltura sono stati aggiunti il supplemento B-27 senza vitamina A (*Invitrogen*), L-glutamina 2 mM, 20 UI/ml di penicillina e streptomicina 20 µg/mL (*Euroclone*). Le cellule tumorali staminali di GBM possono essere mantenute in coltura in sospensione o in adesione.

Le linee cellulari G144, G166, G179 e GliNS2 crescono in adesione, perciò sono state coltivate in flask rivestite di laminina (*Invitrogen*) estratta dal sarcoma murino di EHS, che favorisce l'ancoraggio delle cellule al fondo del supporto di

coltura che 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 monitorato quotidianamente al microscopio a contrasto di fase. Per consentire una crescita cellulare ottimale, ogni 3-5 giorni una parte del terreno viene sostituita con terreno fresco. Tale procedura elimina cataboliti ed eventuali detriti cellulari e fornisce nuovi nutrienti alle cellule.

Quando le colture raggiungono una condizione di semi-confluenza, si procede alla divisione della coltura o *split*. Le cellule che crescono in sospensione come aggregati sferici necessitano di un passaggio di dissociazione meccanica, in quanto se il diametro delle neuro-sfere supera i 100 µm, le cellule che si trovano all'interno della sfera vanno incontro ad ipossia. Le neuro-sfere sono state disgregate mediante l'utilizzo di micropipetta p200 o fatte passare in siringa con ago G26. Per le cellule adese al substrato di laminina è necessario un trattamento enzimatico con tripsina al fine di staccare le cellule dal fondo del supporto di crescita e permettere il passaggio di divisione della coltura. A tale fine le cellule sono state incubate con tripsina 0,05% (*Euroclone*) per 3 minuti, centrifugate e lavate con PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) al fine di eliminare i residui di tripsina. La sospensione cellulare ottenuta è stata quindi suddivisa in più flask (rivestite con laminina o meno a seconda della linea cellulare), in numero variabile a seconda della quantità di cellule e delle necessità sperimentali, contenenti terreno fresco in modo da favorire la crescita e l'espansione di nuove sfere. In alternativa, la sospensione cellulare è stata trasferita in una provetta criogenica e congelata a -80°C in un apposito contenitore con isopropanolo, aggiungendo preventivamente al terreno di coltura il 10% di DMSO, un agente crioprotettivo; il giorno seguente, la provetta criogenica contenente la coltura congelata è stata trasferita in azoto liquido. Quando, per esigenze sperimentali, è necessario utilizzare le cellule congelate, queste vengono prelevate dall'azoto liquido e lasciate scongelare in ghiaccio; successivamente si effettuano due lavaggi con PBS mediante centrifugazione al fine di eliminare più DMSO possibile, in quanto è

estremamente citotossico a temperatura ambiente. Infine, le cellule sono state seminate in flask con 5 ml di terreno fresco.

3. FARMACI

Sulle linee GBM2, GBM04, G166, G179, G144 e GLINS2 è stato testato l'effetto del Pioglitazone (*Cayman Chemical*). E' stata preparata una soluzione madre a 20mM sciogliendo la polvere (PM=394,5 g/mol) in PBS1X. Lo stock ottenuto è stato quindi suddiviso in aliquote conservate a -20°C e scongelate al momento dell'uso. Il pioglitazone è stato inoculato alle concentrazioni finali di 50 µM, 30 µM, 10 µM e 1µM. In alcuni saggi è stato anche testato l'effetto di un farmaco antagonista di PPAR γ , il GW9662 (*Sigma Aldrich*). E' stata preparata una soluzione madre a 40mM sciogliendo la polvere (PM=276,67 g/mol) in terreno di coltura. Lo stock ottenuto è stato quindi suddiviso in aliquote conservate a 4°C. Il farmaco è stato inoculato alle concentrazioni finali di 20 µM, 10 µM, 5 µM e 2,5µM.

Sulle linee in esame è stato inoltre testato il trattamento combinato di pioglitazone con acido valproico (*Sigma Aldrich*); anche per quest'ultimo è stata preparata una soluzione madre a 20mM sciogliendo la polvere (PM=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. Il farmaco è stato inoculato alla concentrazione di 2mM.

4. 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. L'MTT è un saggio colorimetrico che permette di misurare l'attività enzimatica del sistema mitocondriale succinato-tetrazolio riduttasi in grado di metabolizzare il sale di tetrazolio MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], 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, con l'utilizzo di una quantità minima di cellule e di terreno. Le cellule sono state seminate con una densità di 40.000 cellule/pozzetto e incubate per 24h a 37°C. Terminato il tempo di incubazione, le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni dei farmaci in studio, mantenendo un pozzetto di controllo con cellule non trattate. In particolare, è stata studiata la vitalità delle sei linee cellulari di GBM dopo trattamento con Pioglitazone, alle concentrazioni di 1-10-30-50 μ M, e GW9662, alle concentrazioni di 2.5-5-10-20 μ M e anche dopo trattamento combinato di PIO 10 μ M e VPA 2mM e 0,5mM. Per tutti i trattamenti 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 μ l di soluzione MTT, ottenuta sciogliendo la polvere di MTT (*Sigma*) in terreno completo in modo da ottenere una concentrazione finale pari a 1 mg/ml. Le cellule sono state poi incubate per 3 ore a 37°C, durante le quali si formano i granuli che sono stati precipitati mediante centrifugazione a 2000 rpm per 20' a 4°C. I granuli di formazano sono stati sciolti utilizzando 150 μ l di etanolo assoluto e spipettando vigorosamente per favorire la solubilizzazione del composto. Quando i granuli sono stati completamente disciolti si ottiene una soluzione violacea di intensità proporzionale alla quantità di prodotto formatosi. La piastra è stata poi posta in agitazione per 15'. Segue un passaggio in centrifuga a 2000 rpm per 10', dopo il quale sono stati prelevati 100 μ l di surnatante che sono stati poi trasferiti in una nuova piastra per la lettura allo spettrofotometro. La lettura spettrofotometrica viene effettuata 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 dai due differenti esperimenti svolti almeno in triplicato.

Determinazione del cooperative index (CI)

Per valutare gli effetti del trattamento farmacologico combinato con PIO e GW e PIO e VPA in tutte le linee cellulari, è stato calcolato il *Cooperative Index* (CI), ricavato confrontando la somma delle percentuali di mortalità cellulare ottenute per ciascun (singolo) agente con la percentuale di mortalità cellulare a seguito del trattamento farmacologico combinato (Aouali et al., 2009). Un valore di $CI < 1$ indica un effetto sinergico, un valore di $CI = 1$ un effetto additivo, un valore di $CI > 1$ un effetto infra-additivo (o antagonistico).

5. TEST DEL TRYPAN BLUE

Al fine di utilizzare un altro parametro per la valutazione della vitalità cellulare in seguito a trattamento farmacologico con PIO è stata effettuata la conta cellulare con emocitometro e colorazione Trypan blue. L'analisi è stata effettuata su quattro delle sei linee (GBM2, G166, G179 e GLINS2) prima e dopo trattamento con PIO 10 e 30 μM dopo 48 e 72 ore. 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 disgregazione 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 Burker). 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 la diagonale del reticolo (16 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.

6. ALLESTIMENTI DI PREPARATI CROMOSOMICI

Le linee cellulari a nostra disposizione sono state sottoposte ad un'indagine citogenetica finalizzata alla determinazione dell'indice mitotico e alla valutazione dei nuclei polimorfici. 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 PIO 10µM e PIO10µM +VPA 2mM 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:alcol 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. Sugli stessi allestimenti cromosomici è stata poi effettuata l'analisi dei nuclei polimorfici contandone il numero su 1000 nuclei con morfologia normale.

7. ANALISI MORFOLOGICA

Per evidenziare le modificazioni morfologiche indotte dalla somministrazione di pioglitazone nelle sei 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 due esperimenti: 1) un controllo negativo con il terreno costituito da

DMEM/ F12 e Neurobasal 1:1; 2) una coltura per ciascuna concentrazione di PIO (1-10-30-50 μ M) nel medesimo terreno (D-MEM/F12 e Neurobasal 1:1). Le cellule trattate con PIO sono state analizzate dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento. 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 trattate con PIO μ M per 72 ore. L'effetto prodifferenziativo del PIO sulle CSCs da GBM è stato analizzato considerando marcatori specifici sia per il mantenimento della staminalità che per il differenziamento nei diversi lineages neurali. 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 effettuare un saggio di immunofluorescenza, è necessario che le cellule siano adese alla superficie di un supporto, come ad esempio un vetrino o un vetrino coprioggetto. Viste le condizioni di coltura e il breve periodo di tempo di incubazione, per permettere l'adesione cellulare al vetrino le cellule sono state centrifugate a 450 rpm per 5 minuti mediante l'utilizzo di un cytospin (modello Cytospin 2, *Shandon*) che permette la creazione di spot su vetrini mediante forza centrifuga. Il protocollo prevede come primo passaggio due lavaggi rapidi con 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 con Polyvinyl alcohol mounting medium (Fulka Analytical). I vetrini sono stati conservati al buio a 4°C fino al momento dell'osservazione con microscopio confocale a fluorescenza Zeiss LSM 710. Per ogni vetrino sono state analizzate 100 cellule. La sovrapposizione o merge delle immagini ottenute è stata eseguita con Adobe Photoshop CS6 Extended versione 13.0.

9. RT-PCR

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 stato eseguito 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 linee cellulari GBM2, G179, G166, GLINS2, G144, GBM04 trattate e non trattate con PIO 10 μ M e con PIO+VPA 2mM per 96h per valutare eventuali variazioni dell'espressione di geni coinvolti nel *pathway* di PPAR α e Wnt in seguito alla somministrazione dei farmaci.

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 minuti 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 in 10 mM Tris Cl ph 8.0 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.

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.

PCR Array

L'array PCR è stato effettuato in piastre da 96 pozzetti, costituite da otto file contenenti ciascuna 5 primers per geni coinvolti nel pathway di Wnt e 5 primers per geni coinvolti nel pathway di PPAR γ più due geni 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 di una mix per ogni campione da analizzare costituita da 1350 µl di RT² SYBR Green Mastermix (*Qiagen*), 102 µl di cDNA del campione e 1248 µl di acqua RNasi-free. Ogni mix è stata, quindi, aliquotata nei 12 pozzetti della piastra, ognuna su una fila differente (25 µl per pozzetto) e la piastra completa viene poi mantenuta in ghiaccio. Dopo aver sigillato i pozzetti con tappi costituiti da plastica 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 [Fig.8].

Cycles	Duration	Temperature	Comments
1	10 min	95°C	HotStart DNA Taq Polymerase is activated by this heating step.
40	15 s	95°C	
	1 min	60°C	Perform fluorescence data collection.

Figura 8. Programma di funzionamento per termociclature Applied Biosystems.

Infine per ogni pozzetto è stato calcolato, attraverso un *software*, il ciclo soglia (CT), 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 termociclature 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 per la 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 CT è inversamente proporzionale alla quantità di cDNA presente inizialmente: a CT 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 delta ΔC_t . La quantificazione dell'espressione dell'mRNA di interesse viene calcolata come $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (fold-change). Il C_t viene calcolato sottraendo il C_t del controllo endogeno, ovvero del gene housekeeping (il gene *HPRT*, hipoxanthine phosphoribosyltransferase 1; e il gene *TBP*, TATA box binding protein) 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 due linee considerate trattate con PIO 10 μ M o con PIO+VPA 2 mM per 96h). 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 viene riportato come upregulation e il fold-regulation è uguale al fold-change. Valori di fold-change minori di uno, invece, indicano una downregolazione e il fold-regulation è l'opposto negativo del fold-change.

10. TEST DI INVASIONE

Il *Boyden chamber assay* (Cell Biolabs) è un test sviluppato per la valutazione *in vitro* della capacità di migrazione cellulare. Esso prevede l'utilizzo di un apposito *kit* costituito da due camere isolate da una membrana in policarbonato, i cui pori hanno dimensioni inferiori a quella cellulare. Le cellule mobili sono poste nella camera superiore, mentre quella inferiore è riempita dal fluido chemio-attrattante, che stimola la migrazione cellulare. Le cellule con più elevata mobilità migrano dalla camera superiore verso quella inferiore, rimanendo intrappolate nella membrana che le separa. Questo kit permette di valutare la capacità invasiva cellulare mediante l'utilizzo di un chemio-attrattante, nel nostro caso FBS (*fetal bovine serum*), che ne stimola la migrazione attraverso un filtro. Il *Boyden chamber Assay* è stato eseguito su 6 linee di cellule staminali tumorali da GBM (GBM2, GBM04, G179, GliNS2, G144, G166) trattate per 48 ore con PIO 10 μ M. Per ciascuna linea è stato condotto un test di controllo dove alla sospensione cellulare non è stato addizionato il farmaco.

La membrana è stata reidratata, per un ora a temperatura ambiente, con 300 μ l di terreno, rimossi prima di aggiungere la sospensione cellulare. Per ciascuna linea sono stati preparati 300 μ l di sospensione cellulare ($0,5 \times 10^6$ cellule/ml), ai quali sono stati aggiunti 30 μ l di PIO 100 μ M. La sospensione cellulare è stata poi inserita all'interno della camera superiore (o inserto), al fondo della quale è presente la membrana che interfaccia la camera inferiore, precedentemente riempita con 500 μ l di terreno contenente 10% di siero fetale bovino (FBS). Le

cellule sono state poi incubate per 48 ore a 37°C in termostato (5% CO₂, 95% umidità). Trascorso il tempo di incubazione, è stato aspirato il medium presente all'interno dell'inserito, senza arrecare alcun danno alla membrana. Successivamente, la punta imbevuta di un tampone è stata leggermente premuta contro la membrana al fine di eliminare le cellule non intrappolate presenti sulla sua superficie e sulle pareti dell'inserito. La camera superiore è stata immersa in un pozzetto contenente 400 µl di *Cell Stain Solution* per 10' a temperatura ambiente e successivamente lavata (con H₂O distillata) e asciugata. Ogni inserto è stato trasferito all'interno di un pozzetto vuoto; Ad ogni inserto sono stati aggiunti 200 µl di *Extraction Solution*, e mantenuti per 10' in agitazione. Al termine dei 10', da ciascun campione sono stati prelevati 100 µl, contenenti le cellule estratte dalla membrana, che sono stati trasferiti nei pozzetti di una piastra di una multiwell da 96 per la lettura allo spettrofotometro ($\lambda = 560 \text{ nm}$). Le membrane contenenti le cellule intrappolate sono state, prima dell'estrazione, osservate al microscopio a contrasto di fase e fotografate a diversi ingrandimenti (4X, 10X, 20X) utilizzando il programma Leica Application Suite V3 installato su un pc collegato allo stesso microscopio.

11. ANALISI STATISTICA

Sono state effettuate analisi statistiche sui dati grezzi ottenuti dagli esperimenti tramite test di Fisher per l'immunofluorescenza, test *t*-student per i saggi MTT e saggi di migrazione cellulare, test χ -quadro per l'indice mitotico e il conteggio dei nuclei polimorfici. Sono stati considerati significativi i confronti con *p-value* < 0,05.

Risultati

STUDI PRELIMINARI

Studi precedenti a questo lavoro svolti nel nostro laboratorio, ci hanno permesso di caratterizzare le linee in esame dal punto di vista genetico-genomico; tra le analisi svolte è stato effettuato il cariotipo molecolare di tutte le linee in esame, attraverso array CGH, per evidenziare eventuali alterazioni genomiche nel numero di copie (copy number alterations) (Baronchelli, Bentivegna et al. 2013). Questi dati ci hanno permesso di evidenziare come, in tutte le linee, non ci siano delezioni (loss) a carico del locus 3p25.2 in cui mappa il gene PPAR γ ; l'unica linea che risulta alterata è la G166 che presenta il gain dell'intero cromosoma 3. Per confermare l'espressione del recettore, abbiamo effettuato un'analisi di immunofluorescenza che ha messo in luce l'effettiva presenza di PPAR γ in tutte e sei le linee: GBM2, G144, G166, GLINS2, G179 e GBM04 [Fig.9].

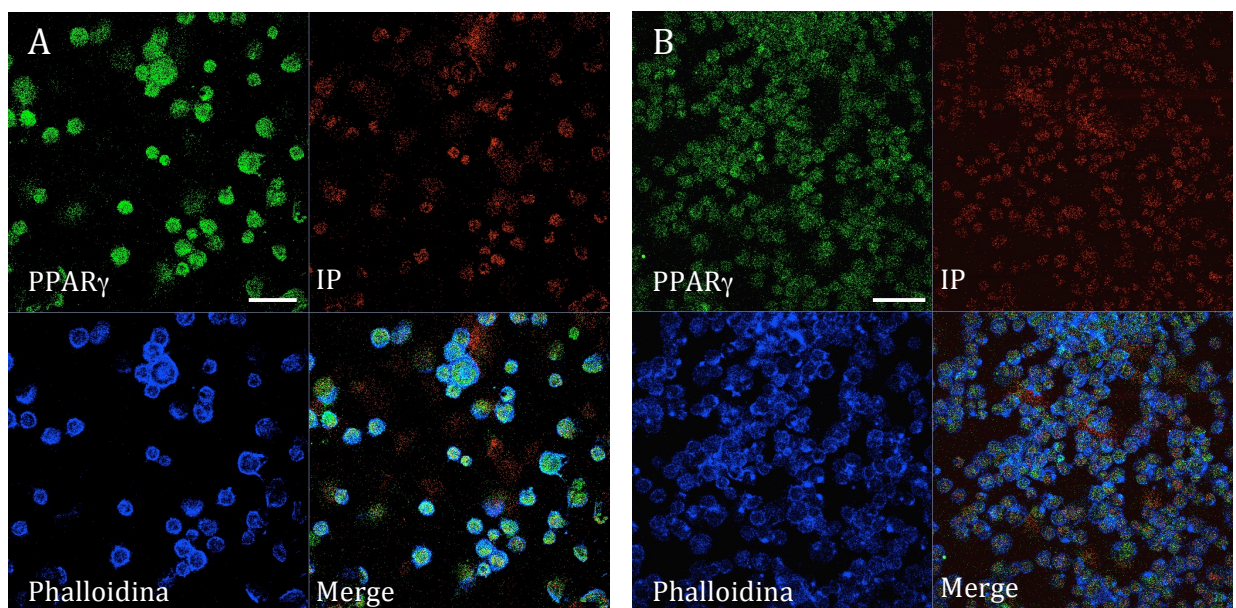


Figura 9. Immagini rappresentative dell'espressione di PPAR γ nelle linee G179 (A) e GBM2 (B). I nuclei sono marcati in rosso con ioduro di propidio, PPAR γ in verde, il citoscheletro in blu utilizzando la falloidina. La barra bianca corrisponde a 50 μ m.

1. VALUTAZIONE DEL POTENZIALE EFFETTO CITOTOSSICO/CITOSTATICO DEL PIOGLITAZONE

1.1 EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON PIOGLITAZONE SULL'ATTIVITA' METABOLICA E SULLA VITALITA' CELLULARE

Al fine di determinare se il Pioglitazone potesse avere un effetto inibitorio sull'attività metabolica delle linee di GSCs, sono stati eseguiti dei saggi di vitalità cellulare tramite MTT assays. I dati di seguito riportati sono espressi come percentuale di sopravvivenza rispetto al controllo non trattato. Sono state testate concentrazioni crescenti di farmaco (1-10-30-50 μ M) 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* e sono stati considerati significativi quelli con *pvalue*<0,05 [Tab.Suppl.1].

Nei trattamenti con concentrazioni crescenti di PIO per 24 ore si assiste ad una variabilità di risposta delle sei linee in esame; per le linee GBM04 e G179 è stata registrata una riduzione apprezzabile della percentuale di cellule metabolicamente attive pari al 47% ($p<0,001$) e 55% ($p<0,001$), alla concentrazione più alta di PIO. Anche per le linee G166, GBM2 e GLINS2 si è assistito ad un modesto decremento dell'attività metabolica pari al 68% per la prima e 83% e 81% rispettivamente per le altre due linee. Inoltre, per le linee GBM04 e GLINS2, si osserva una riduzione dose-dipendente rispetto alle altre linee cellulari che mostrano, invece, una minore regolarità di risposta. La linea G144, al contrario, è risultata resistente al trattamento con PIO 24 ore, in quanto si è registrato un aumento della sua attività metabolica rispetto al controllo a tutte le concentrazioni di farmaco [Fig.10, Tab. 2]. Alle 48 ore è evidente come il comportamento delle sei linee, in risposta al trattamento farmacologico, sia più uniforme mostrando una riduzione dell'attività metabolica; si registra infatti una variabilità minore sia tra le diverse linee che all'interno di una stessa linea alle differenti concentrazioni di farmaco. Per la linea G179 si osserva una maggiore riduzione della vitalità, pari al 56% ($p<0,001$) alla

concentrazione più alta del farmaco; le linee GBM2, G166 e G144 mostrano un decremento significativo della vitalità già alla concentrazione di 10 μ M di PIO mentre alle concentrazioni più elevate i valori si mantengono più o meno costanti intorno al 70-80%; per quanto riguarda invece le linee G179, GBM04 e GLINS2 si osserva una riduzione apprezzabile della vitalità ad una concentrazione più alta del farmaco, 50 μ M [Fig.10, Tab. 2].

Alle 72 ore di trattamento ritroviamo una maggior dispersione nel comportamento delle linee in risposta al trattamento farmacologico. Le due linee più responsive al trattamento risultano essere la GBM2 e la GBM04 che raggiungono una riduzione massima pari al 57% ($p < 0,001$) e al 54% ($p < 0,001$), rispettivamente. A seguire troviamo le linee G166 e G179 che mostrano una riduzione che raggiunge rispettivamente il 65% e 63% ($p < 0,001$). Per le linee GBM04, G166 e G179 si osserva una riduzione dell'attività metabolica via via più marcata all'aumentare della concentrazione farmacologica. Anche nella linea G144 è stata osservata una riduzione della vitalità, benchè meno consistente rispetto alle precedenti linee, con un decremento che si mantiene sempre intorno al 95% se non alla dose più alta di PIO che raggiunge il 74% ($p < 0,05$). Per quanto riguarda la linea GLINS2 questa risulta resistente al trattamento alle 72 ore con un'attività metabolica che si mantiene sempre intorno al 90-100% [Fig.10, Tab.2]. In generale, dai dati ottenuti possiamo stabilire che le linee che risentono maggiormente dell'effetto citotossico/citostatico del Pioglitazone alle diverse concentrazioni e ai diversi tempi di trattamento, sono le GBM2, GBM04, G166 e G179, mentre le linee G144 e GLINS2 risultano le meno sensibili.

Successivamente è stato effettuato un altro test di vitalità cellulare, il test del trypan blue, che si basa sulla valutazione di parametri differenti poiché sfrutta la capacità del colorante di penetrare, in maniera selettiva, all'interno di cellule morte. Questo secondo test è stato effettuato su quattro linee (GBM2, G179, G166 e GLINS2) per i due tempi di trattamento più lunghi, 48 e 72 ore, con lo scopo di complementare i risultati ottenuti tramite *MTT assay*. I test sono stati effettuati in duplicato, in due esperimenti indipendenti. Anche in questo caso è stata effettuata un'analisi statistica sui dati grezzi tramite *t test* e sono stati considerati significativi

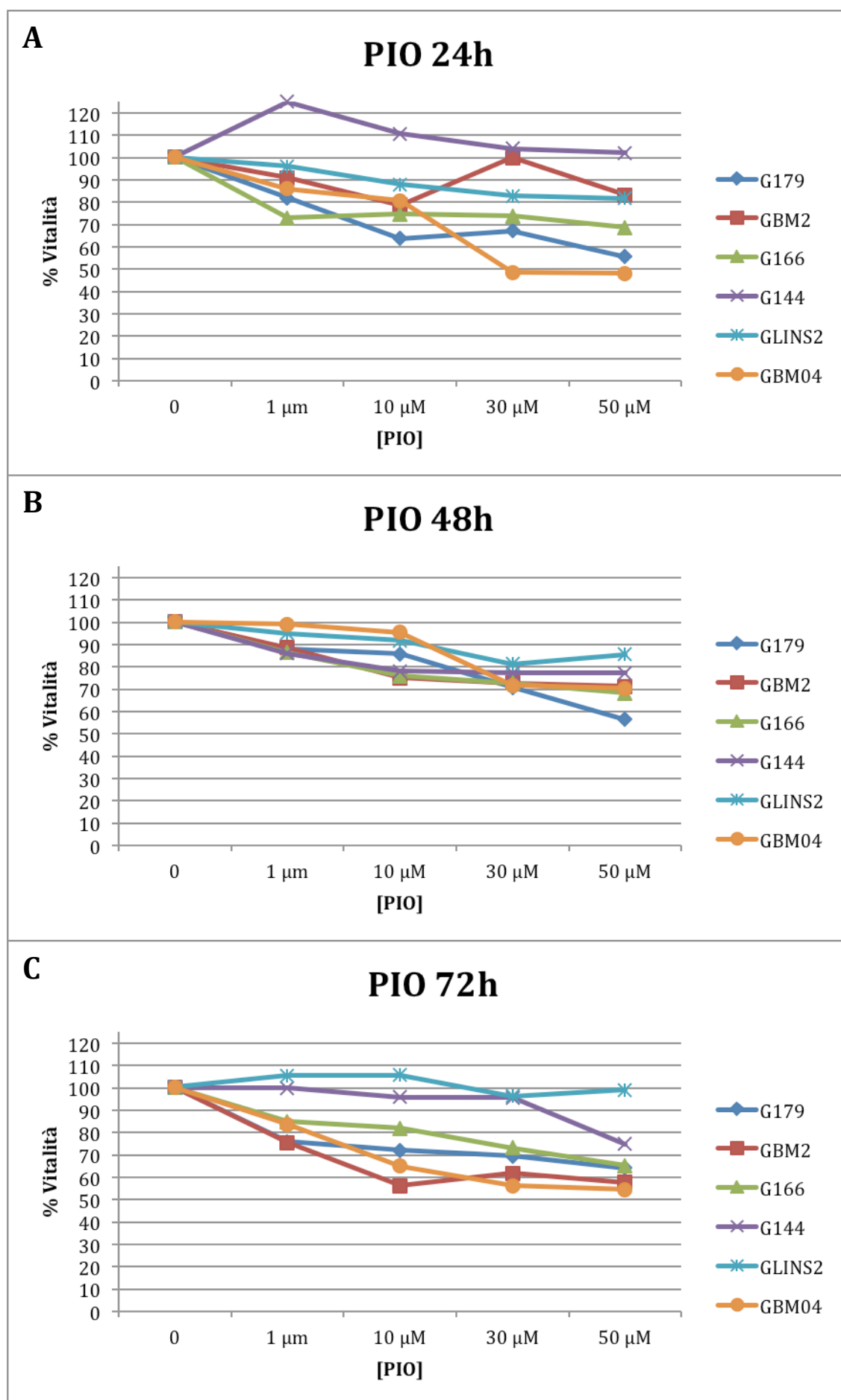


Figura 10. Variazioni della vitalità cellulare nelle linee di GSCs trattate con concentrazioni crescenti di PIO (1-10-10-50 μ M) per 24 (A), 48 (B) e 72 (C) ore. I dati sono derivati dalla media di due esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

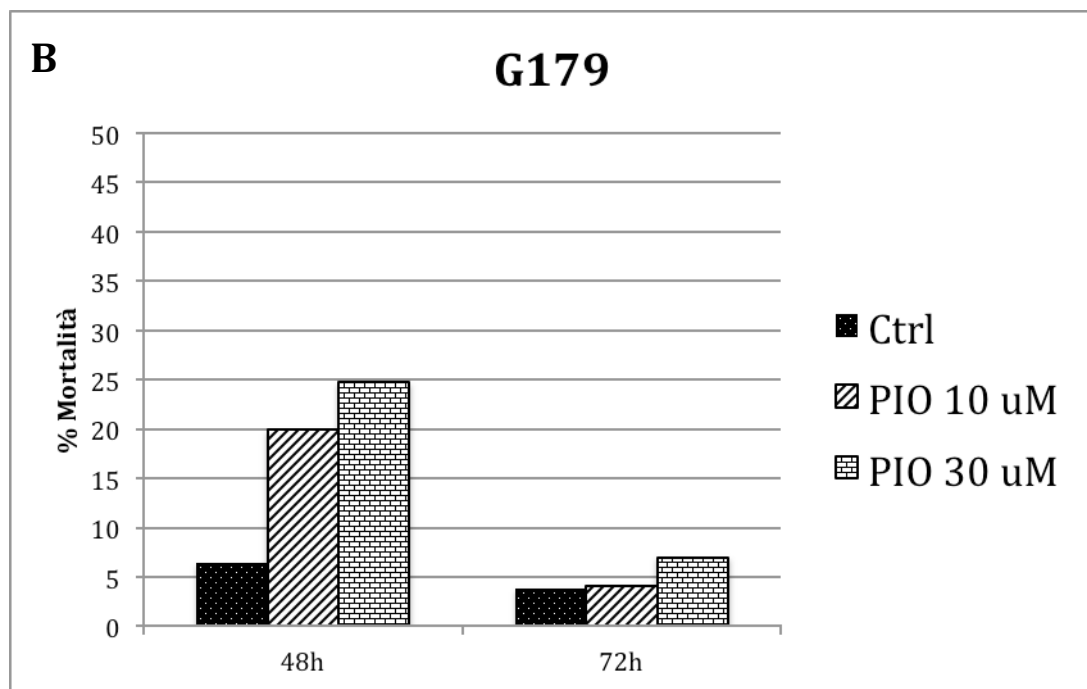
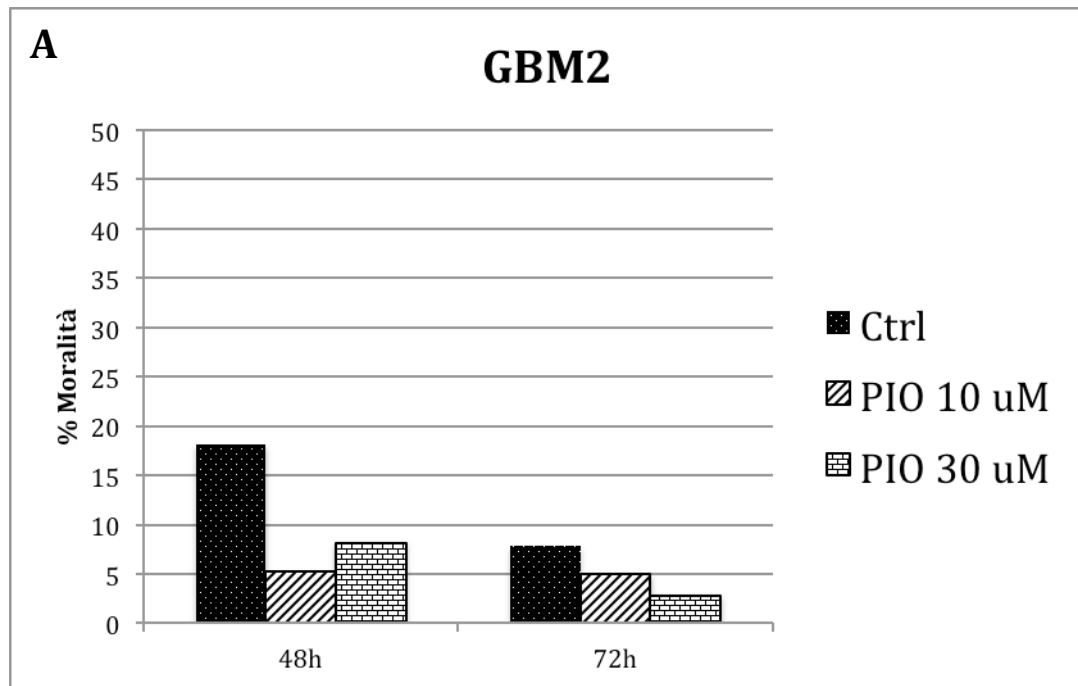
PIO 24h	0	1 μ m	10 μ M	30 μ M	50 μ M
G179	100,18	81,91	63,75	67,09	55,43
GBM2	100,17	90,86	78,59	99,90	83,05
G166	100,00	72,84	74,50	73,74	68,51
G144	100,11	124,91	110,56	103,87	102,06
GLINS2	100,12	95,95	87,87	82,74	81,61
GBM04	100,09	85,90	80,46	48,43	47,85

PIO 48h	0	1 μ m	10 μ M	30 μ M	50 μ M
G179	100,06	87,86	85,51	70,50	56,29
GBM2	100,05	88,39	74,79	72,55	71,08
G166	100,12	86,32	75,87	72,59	68,10
G144	100,00	85,79	78,04	77,12	77,20
GLINS2	100,12	94,96	91,64	81,21	85,44
GBM04	100,06	98,79	95,35	71,44	70,29

PIO 72h	0	1 μ m	10 μ M	30 μ M	50 μ M
G179	100,12	75,71	71,92	69,35	63,98
GBM2	100,08	75,27	56,00	61,69	57,54
G166	100,17	84,90	81,91	73,08	65,05
G144	100,09	99,92	95,78	95,49	74,68
GLINS2	100,21	105,45	105,71	96,17	99,04
GBM04	100,04	83,56	64,79	56,10	54,37

Tabella 2. Percentuali di vitalità cellulare riferite alla fig. I dati sono derivati dalla media di due esperimenti indipendenti condotti in triplicato. I dati statisticamente significativi sono colorati in grigio e sono stati identificati tramite *t test* ($p < 0,05$).

quelli con $pvalue < 0,05$ [Tab.suppl.2]. La figura 11 mostra i risultati ottenuti, mettendo in evidenza una riduzione della mortalità nella linea GBM2, sia a 48 che a 72 ore di trattamento con PIO. La linea G179, al contrario, mostra un aumento della mortalità dopo 48 ore di trattamento farmacologico, aumento che viene mantenuto, seppur in misura più ridotta, dopo 72 ore di trattamento con PIO. Nella linea G166 si registra un leggero aumento della mortalità dopo 48 ore di trattamento mentre dopo 72 ore le cellule trattate non sembrano risentire dell'effetto del farmaco rispetto a quelle non trattate. La linea GLINS2 mostra invece un aumento della mortalità cellulare dose-dipendente sia a 48 che a 72 ore di trattamento con PIO.



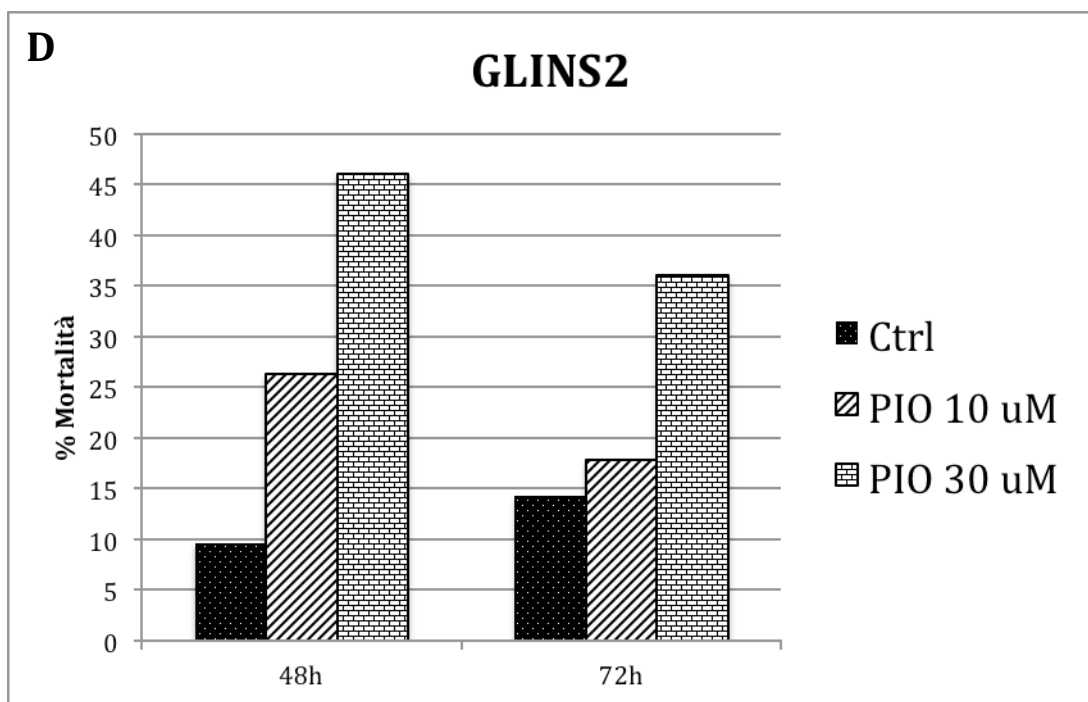
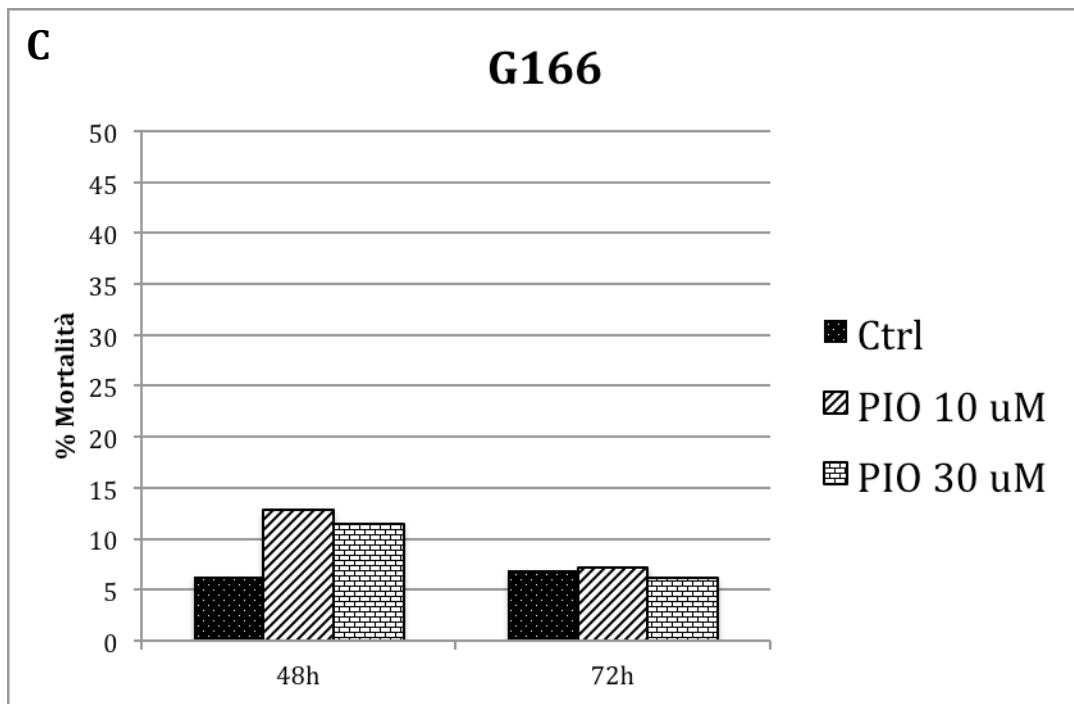


Figura 11. Variazioni della mortalità cellulare in seguito a trattamento con PIO 10 E 30 μ M dopo 48 e 72 ore nelle linee GBM2 (A), G179 (B), G166 (C) e GLINS2 (D). I dati sono derivati dalla media di due esperimenti indipendenti.

1.2 EFFETTI DEL PIOGLITAZIONE SULLA CAPACITÀ PROLIFERATIVA E SULLA MORFOLOGIA NUCLEARE

Nel corso del presente studio ci si è posti, inoltre, l'obiettivo di determinare se la somministrazione di Pioglitazone inducesse o meno una variazione delle caratteristiche citogenetiche e citologiche delle GSCs in esame. A tal fine i preparati cromosomici delle linee sono stati esaminati per consentire 1) la determinazione dell'indice mitotico, 2) la valutazione del numero di nuclei aberranti.

Per determinare se il Pioglitazone fosse in grado di influenzare la proliferazione cellulare, per ciascuna linea è stato valutato l'indice mitotico attraverso il conteggio del numero di metafasi presenti ogni 1000 nuclei. I *tests* sono stati condotti in replica, in due esperimenti indipendenti, e per determinare se le differenze riscontrate rispetto al CTRL non trattato fossero o meno statisticamente significative, è stato eseguito il test del *Chi-quadro* (χ^2) stabilendo un valore limite di significatività pari a $p < 0,05$ (Tab.Suppl. 6). I risultati dell'analisi sono riportati in Figura 12 e in Tab Suppl. 3. Le diverse linee cellulari sono state esposte per 48 ore ad una concentrazione di PIO pari a $10\mu\text{M}$, che, dalle diverse analisi effettuate, è risultata essere la concentrazione minima efficace.

Anche in questo caso i risultati ottenuti mettono in luce l'eterogeneità delle linee in esame, visibile non solo nella variabilità di risposta al trattamento ma anche nella differente capacità proliferativa delle sei linee in condizioni basali. Complessivamente, la somministrazione di PIO $10\mu\text{M}$ per 48 ore ha determinato una riduzione dell'indice mitotico in tutte le linee esaminate tranne una. Tale diminuzione è risultata statisticamente significativa nelle linee G166, GBM2 e GLINS2 ($p < 0,01$ per la linea). Fa eccezione la linea GBM04 che mostra un aumento, seppur non statisticamente significativo, dell'indice mitotico.

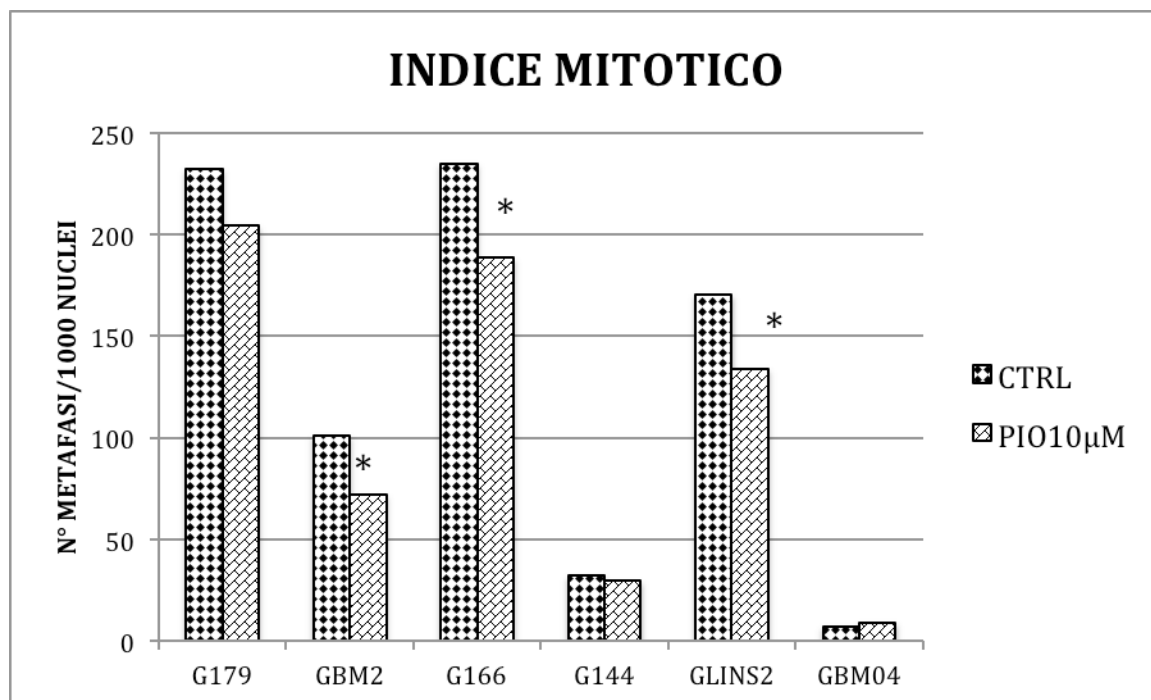


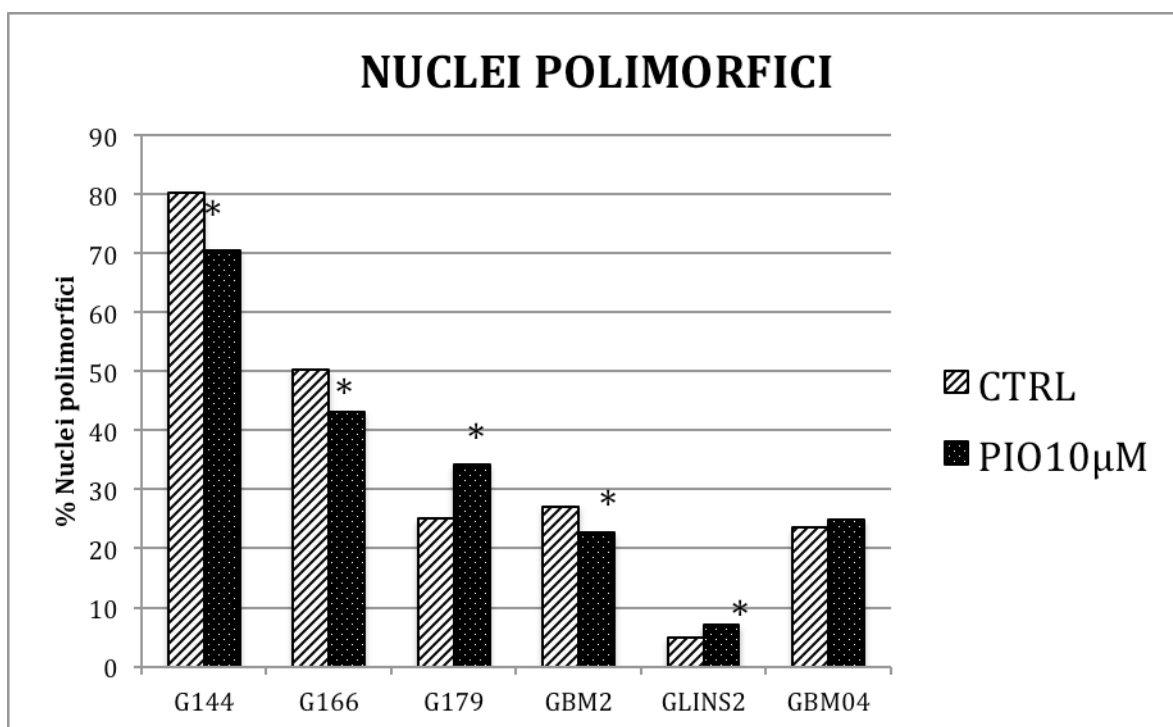
Figura 12. Gli istogrammi rappresentano l'indice mitotico di sei linee di GSCs, espresso come n° di metafasi su 1000 nuclei in percentuale. Tale analisi è stata eseguita su campioni di controllo non trattati e su campioni trattati con PIO 10µM per 48 ore. L'analisi statistica è stata eseguita con test del Chi-quadro (χ^2) con correzione di Yates (* $p < 0,05$)

L'osservazione microscopica dei preparati cromosomici ha evidenziato la presenza massiva di nuclei morfologicamente anomali, chiaro indice della natura aberrante delle GSCs analizzate. In tutte le linee esaminate sono stati riscontrati nuclei con forma lobata, polilobata e a "ciambella" (Fig. 14). Sono stati individuati, inoltre, nuclei caratterizzati dalla presenza di estroflessioni della membrana nucleare definite "*blebs*" ed altri connessi da ponti citoplasmatici, la cui formazione potrebbe derivare da una divisione mitotica incompleta o da ritardo anafasico. L'instabilità nella segregazione mitotica si evince anche dalla presenza di micronuclei, frammenti di cromosoma, o interi cromosomi, che non vengono correttamente incorporati nel nucleo principale durante le ultime fasi della divisione cellulare.

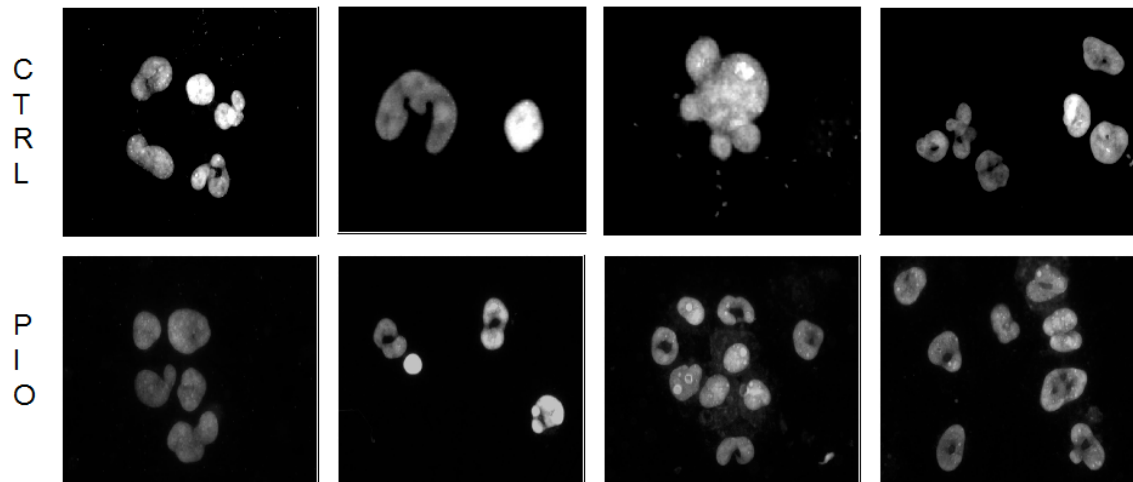
Per ogni campione sono stati, quindi, contati 1000 nuclei, operando una distinzione fra quelli dotati di forma regolare e quelli morfologicamente aberranti, indice di sofferenza cellulare. I *test* sono stati condotti in replica, in due esperimenti indipendenti e le percentuali ottenute in seguito a tale conteggio sono

riportate in Tabella Suppl. 4 e rappresentate in Figura 13. Anche in questo caso, il test del Chi-quadro è stato effettuato confrontando i valori del trattamento (PIO 10 μ M per 48h) con quelli del controllo non trattato (Tab.Suppl.5) .

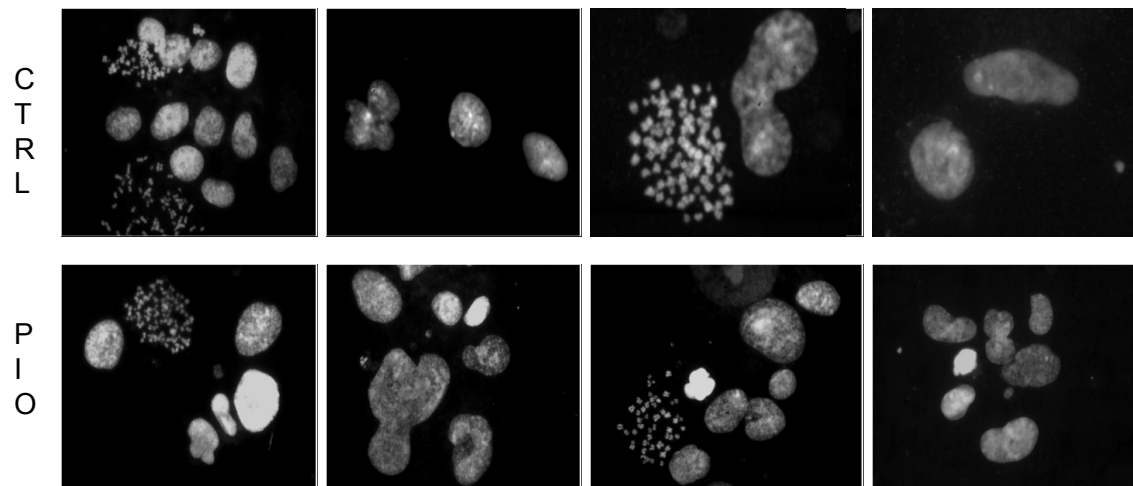
Osservando i dati ricavati dai conteggi, è possibile operare una distinzione sulla base della percentuale di nuclei polimorfici riscontrati nel controllo: le linee G179 e GLINS2 presentano un numero esiguo di nuclei aberranti di partenza (250 e 49,5 in media, rispettivamente), valori che risultano significativamente incrementati in seguito a trattamento farmacologico ($p < 0,05$). Nelle linee G144, G166 e GBM2, invece, le alterazioni citologiche sono già più frequenti nell'ambito del CTRL e risultano significativamente diminuite in seguito a trattamento con PIO ($p < 0,05$).



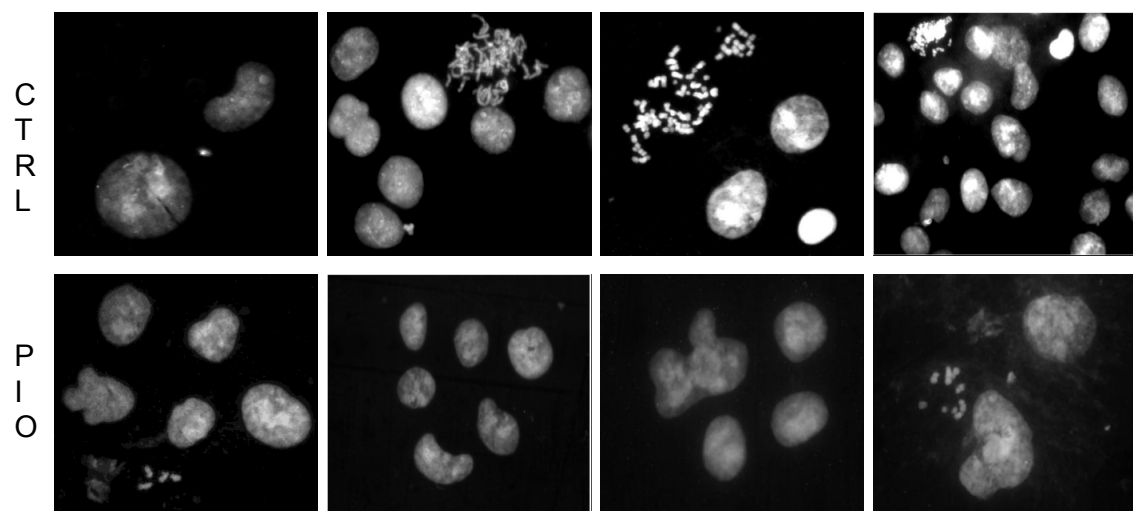
G144



G166



GBM2



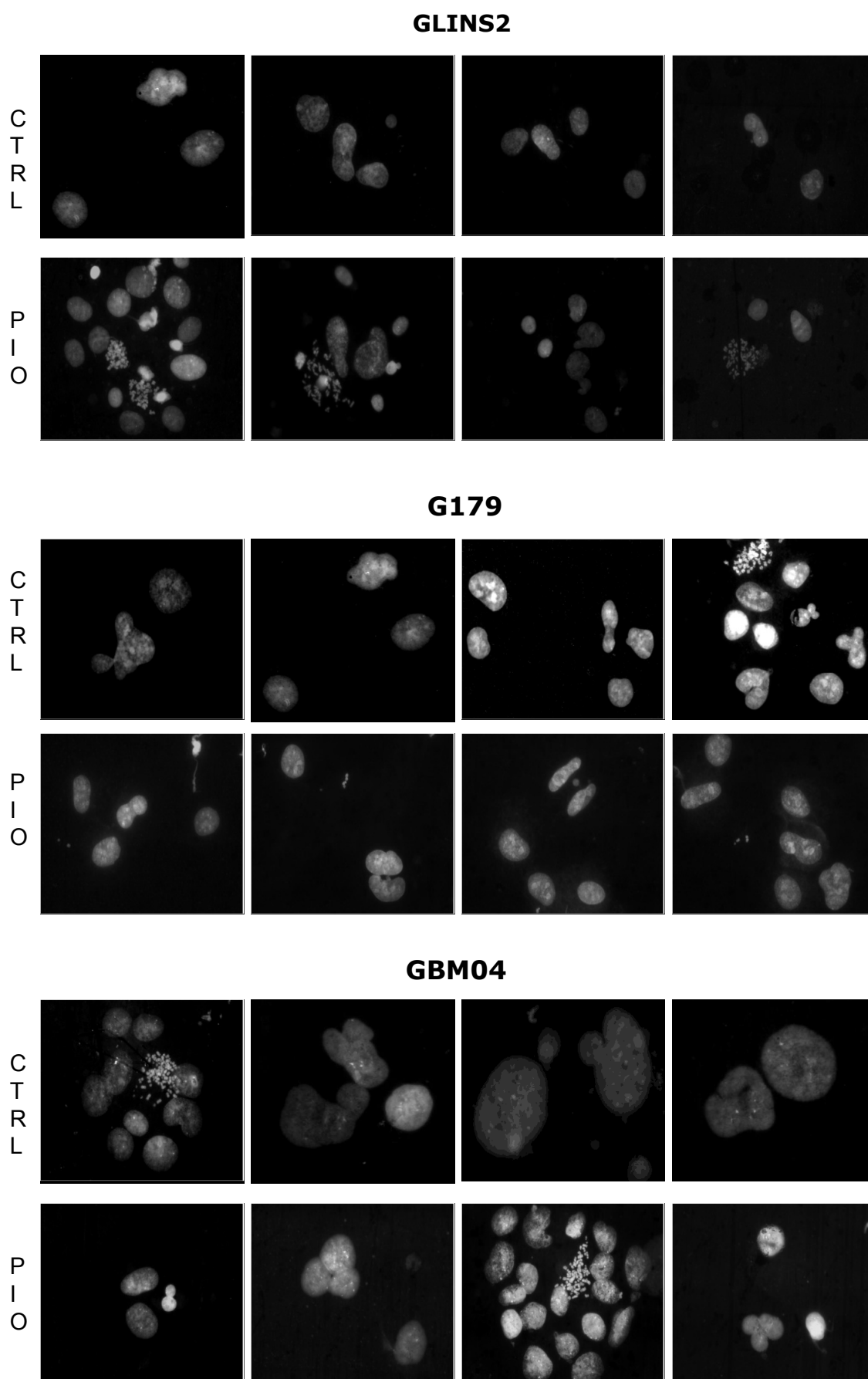


Figura 14. Foto di nuclei dalla morfologia aberrante delle linee G144, G166, G179, GBM2, GliNS2 e GBM04 prima e dopo trattamento per 48 ore con PIO 10 μ M. È possibile osservare nuclei dalla forma polilobata e a ciambella oltre a materiale cromatinico assemblato in strutture simil-nucleari.

2. VALUTAZIONE DEL POTENZIALE EFFETTO PRO-DIFFERENZIATIVO DEL PIOGLITAZONE

2.1 EFFETTI DEL PIOGLITAZONE SULLA MORFOLOGIA CELLULARE

Sulla base di evidenze in letteratura che indicano un potenziale effetto pro-differenziativo del pioglitazone, al fine di evidenziare l'insorgenza di eventuali modificazioni nella morfologia cellulare provocate dalla somministrazione del farmaco, è stata eseguita un'analisi morfologica sulle sei linee di GSCs a nostra disposizione. L'analisi è stata effettuata dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento a concentrazioni crescenti di PIO(1-10-30-50 μ M), confrontando i risultati ottenuti con colture di controllo non trattate.

L'effetto sulla morfologia del trattamento farmacologico risulta differente nelle sei linee evidenziando, ancora una volta, la variabilità di risposta che caratterizza le GSCs. Dalle immagini riportate è possibile notare come, a concentrazioni più alte del farmaco (30 μ M e 50 μ M), si verifichi la formazione di precipitati dalla struttura filiforme probabilmente dovuti alla composizione del terreno, come dimostrato da altre prove in cui il farmaco è stato addizionato al terreno di crescita in assenza delle cellule. Per le linee GBM2 e GBM04 non si evidenziano cambiamenti significativi della morfologia cellulare in seguito a somministrazione di PIO, tanto che le cellule presentano una morfologia paragonabile a quella dei rispettivi controlli; non si apprezzano variazioni significative nemmeno alle concentrazioni più alte e per tempi più lunghi di trattamento [Fig.15,16].

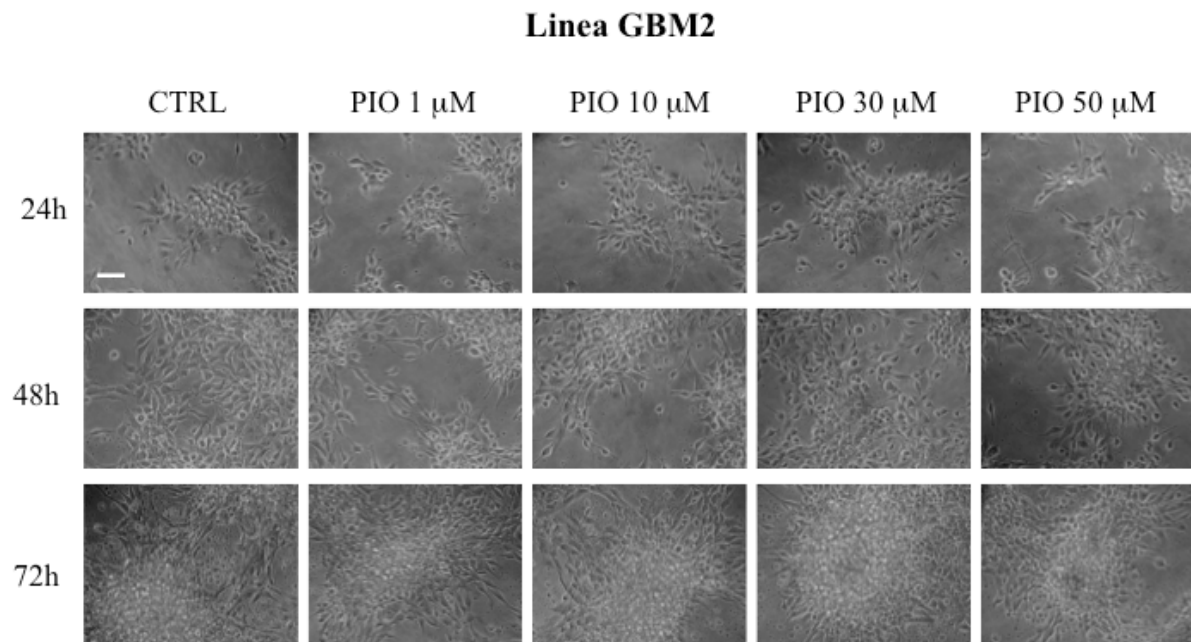


Figura 15. Valutazione delle modificazioni morfologiche indotte dalla somministrazione di PIO alle concentrazioni 1-10-30-50 μ M nella linea GBM2 a tempi diversi dall'esposizione al farmaco (24-48-72 h). La barra corrisponde a 100 μ m.

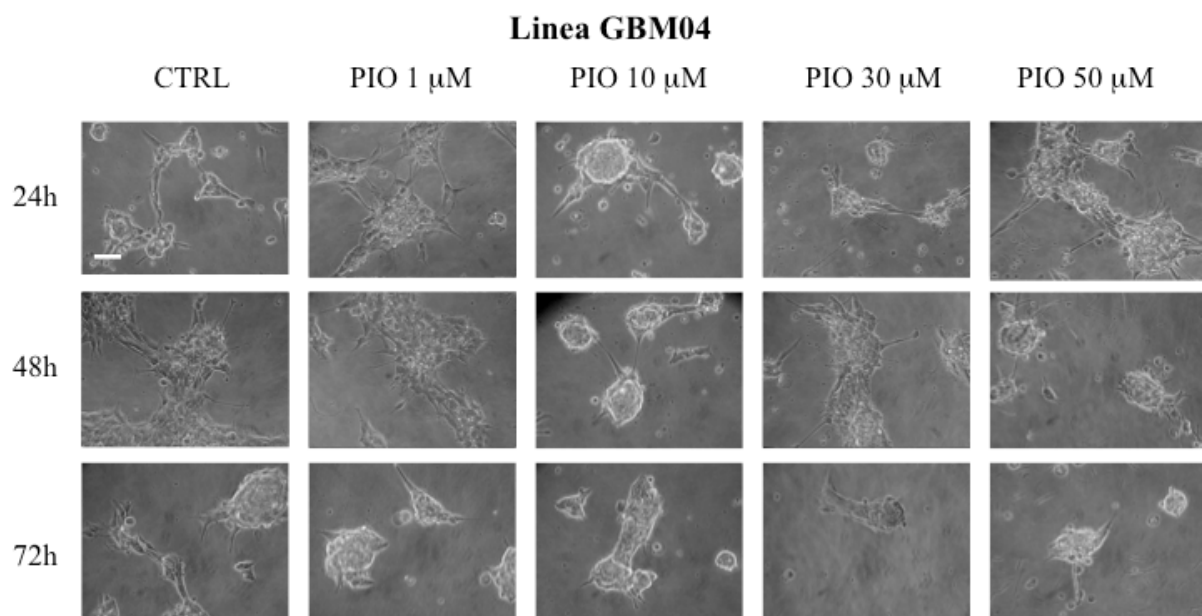


Figura 16. Valutazione delle modificazioni morfologiche indotte dalla somministrazione di PIO alle concentrazioni 1-10-30-50 μ M nella linea GBM04 a tempi diversi dall'esposizione al farmaco (24-48-72 h). La barra corrisponde a 100 μ m.

Le cellule non trattate della linea G144 presentano la morfologia tipica delle cellule staminali neurali e risultano aggregate in ammassi sferici in sospensione, detti “neurosfe” [Fig.17]. Alle 24 ore di trattamento si è osservata la comparsa di cellule con morfologia fusiforme o poligonale e cellule presentanti sottili estroflessioni. Alle 48 e 72 ore, le cellule tornano a formare delle neurosfere di dimensioni tali da non poterne apprezzare le caratteristiche morfologiche [Fig.17].

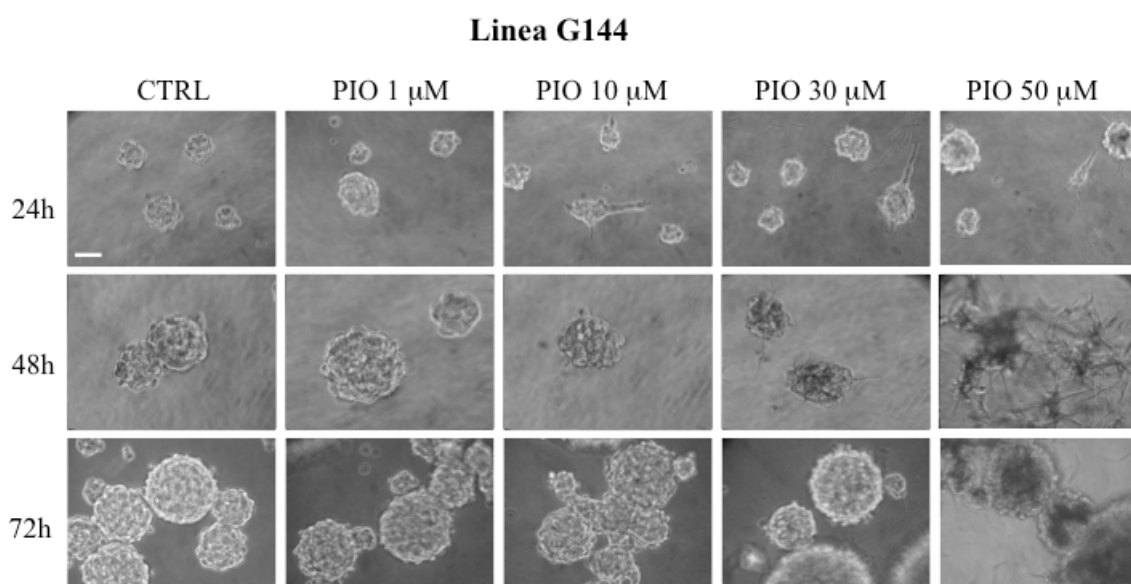


Figura 17. Valutazione delle modificazioni morfologiche indotte dalla somministrazione di PIO alle concentrazioni 1-10-30-50 μ M nella linea G144 a tempi diversi dall’esposizione al farmaco (24-48-72 h). La barra corrisponde a 100 μ m.

Lo stesso comportamento si osserva per quanto riguarda la linea G166 che mostra variazioni nella morfologia cellulare solo a 24 ore di trattamento; queste modificazioni non vengono però mantenute a 48 e 72 ore di trattamento poiché le cellule tornano ad assumere una forma tondeggiante, paragonabile a quella dei rispettivi controlli [Fig.18]. Inoltre, alle 72 ore di trattamento e per le concentrazioni più alte di PIO (30 μ M e 50 μ M), si osserva una prevalenza

dell'effetto citotossico del farmaco con la presenza di cellule morte e detriti cellulari.

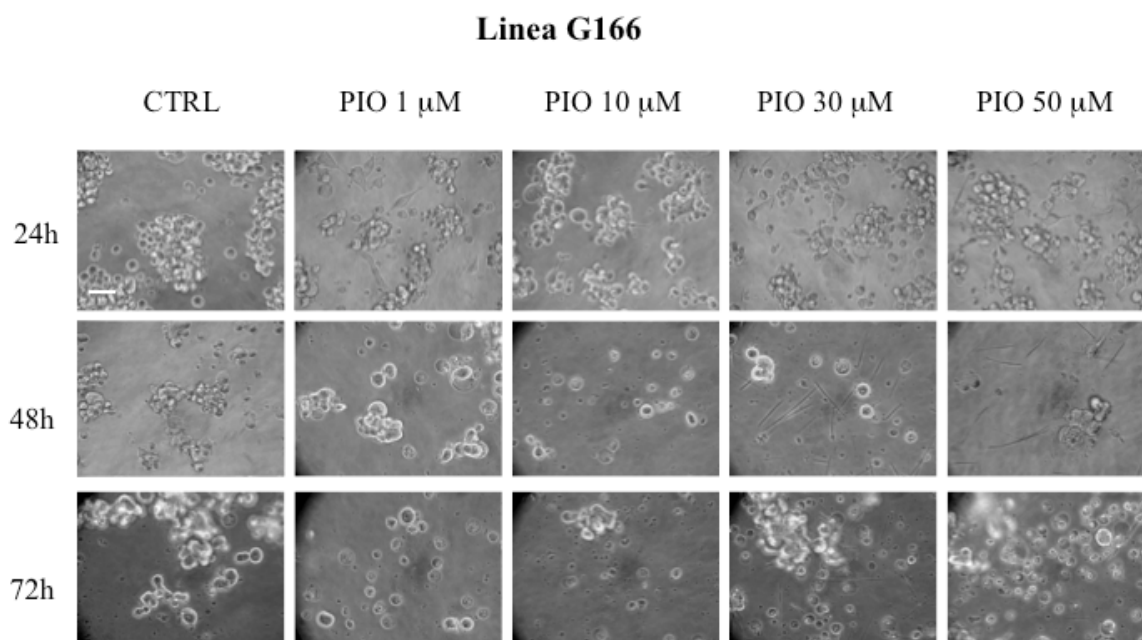


Figura 18. Valutazione delle modificazioni morfologiche indotte dalla somministrazione di PIO alle concentrazioni 1-10-30-50 μ M nella linea G166 a tempi diversi dall'esposizione al farmaco (24-48-72 h). La barra corrisponde a 100 μ m.

Anche la linea G179 sembra risentire, alla concentrazione più alta di farmaco, dell'effetto citotossico del PIO mostrando un aumento di cellule apparentemente morte che si staccano dalla superficie di crescita, chiaro indice di sofferenza cellulare [Fig.19]. Per la linea GliNS2, esposta per 24 ore al trattamento con PIO, non si registrano particolari cambiamenti morfologici rispetto al controllo. Alle 48 e alle 72 ore, le cellule esposte alle concentrazioni più alte del farmaco (30 μ M e 50 μ M) sembrano presentare un aumento nel numero e nella lunghezza delle estroflessioni [Fig.20].

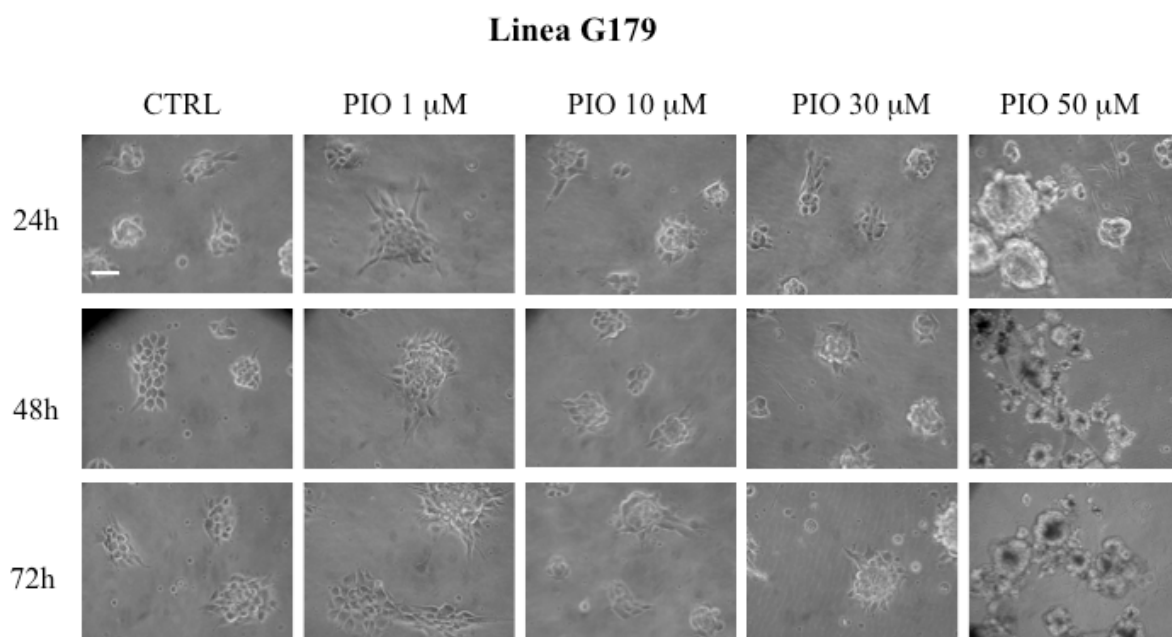


Figura 19. Valutazione delle modificazioni morfologiche indotte dalla somministrazione di PIO alle concentrazioni 1-10-30-50 μ M nella linea G179 a tempi diversi dall'esposizione al farmaco (24-48-72 h). La barra corrisponde a 100 μ m.

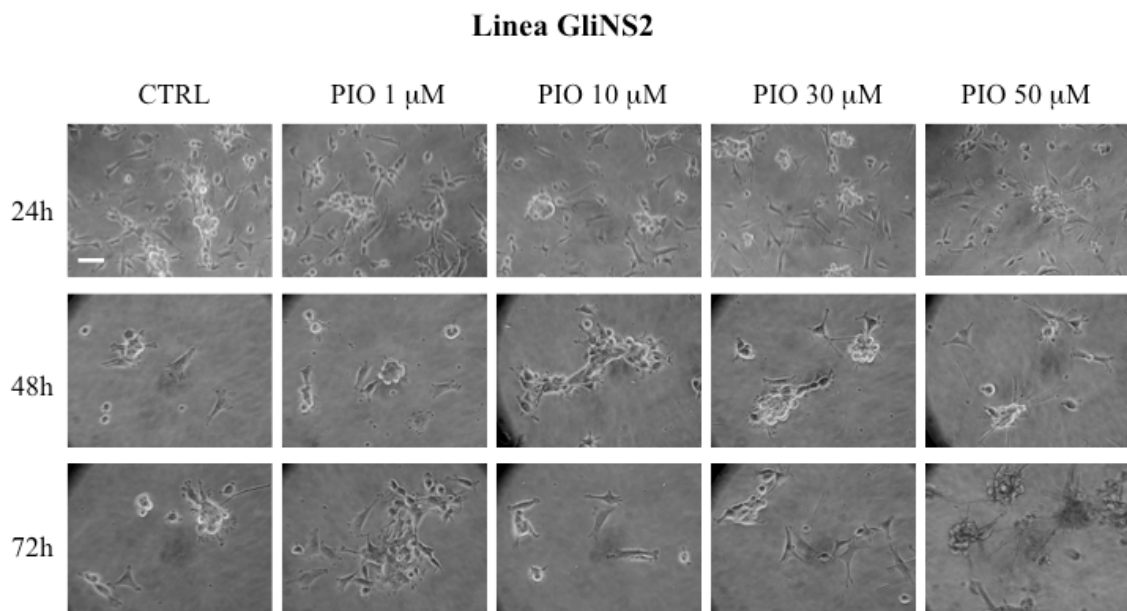


Figura 20. Valutazione delle modificazioni morfologiche indotte dalla somministrazione di PIO alle concentrazioni 1-10-30-50 μ M nella linea GLINS2 a tempi diversi dall'esposizione al farmaco (24-48-72 h). La barra corrisponde a 100 μ m.

2.2 STUDIO DELLE VARIAZIONI DEI MARCATORI DI STAMINALITÀ E DIFFERENZIAMENTO INDOTTE DAL PIOGLITAZIONE

Per caratterizzare a livello molecolare eventuali effetti pro-differenziativi indotti dal Pioglitazone sono stati eseguiti esperimenti di immunofluorescenza (IF) sulle sei linee di cellule staminali tumorali da GBM in esame esposte per 72 ore alla concentrazione di 10 μ M di Pioglitazone.

Ai fini dello studio 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 stati costituiti cinque livelli d'espressione, ai quali è stato attribuito un simbolo indicativo:

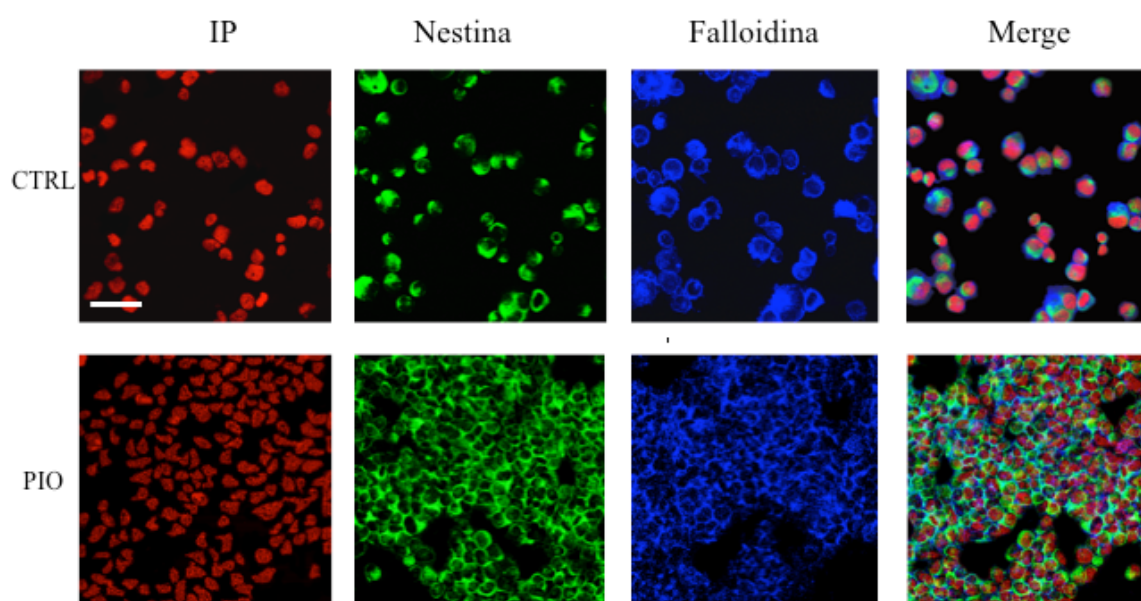
- I livello: 0-20% (-)
- II livello: 20-40% (-/+)
- III livello: 40-60% (+)
- IV livello: 60-80% (++)
- V livello: 80-100% (+++)

Di seguito sono riportate alcune immagini significative [Fig.21] e una tabella riassuntiva comprendente i risultati degli esperimenti di immunofluorescenza effettuati su tutte le linee [Tab.3].

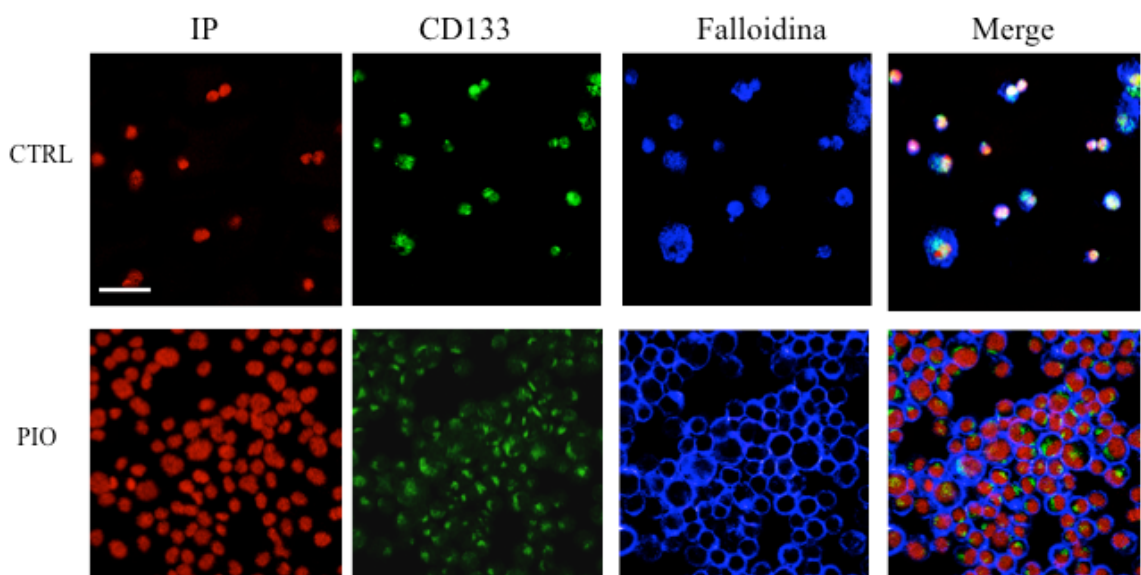
Per la linea GBM2 in seguito a trattamento farmacologico si osserva una riduzione dell'espressione dei marcatori di staminalità CD133 e Nestina, rispettivamente dal 62,96% del non trattato al 50% del trattato con PIO e dal 75,44 % allo 0%. Inoltre si osserva anche la completa assenza di tutti e tre i marcatori di differenziamento,

TUJ1, GFAP e MBP, per i quali la percentuale di espressione nei controlli non trattati è rispettivamente del 19.27%, 63.81% e 100%. Al contrario, per la linea G144 si osserva, dopo trattamento, un aumento statisticamente significativo dell'espressione del marcatore CD133 e dell'espressione del marcatore Nestina. Per entrambi i marcatori l'espressione interessa il 100% delle cellule trattate. Per la stessa linea si osserva anche un aumento statisticamente significativo dell'espressione dei marcatori di differenziamento con percentuali che aumentano dal 45,79% al 100% per TUJ1 e dall'82,46% al 100% per GFAP, mentre si osserva una riduzione del 100% nell'espressione del marcatore MBP. Per la linea G166 l'espressione dei marcatori di staminalità si riduce significativamente tra controllo e trattato. Dopo trattamento risultano significative anche le variazioni dell'espressione di tutti e tre i marcatori di differenziamento. L'espressione di TUJ1 aumenta dal 25,92% nel controllo al 100% nel trattato, mentre l'espressione di GFAP aumenta dall'83,9% al 100%. Al contrario l'espressione di MBP si riduce del 100%. Per la linea GLINS2 si osserva invece una riduzione significativa dell'espressione di tutti e tre i marcatori di differenziamento, dove TUJ1 e MBP sono del tutto assenti nella linea trattata. Nella stessa linea si osserva, a seguito del trattamento con pioglitazone, una riduzione significativa dell'espressione di Nestina rispetto al controllo non trattato (79,63%). L'espressione di CD133 rimane invece invariata, rimanendo espresso sia nei controlli che nelle cellule trattate. Per la linea GBM04 si osserva un aumento statisticamente significativo di tutti e tre i marcatori di differenziamento in seguito a trattamento, che passano da 76,8% (TUJ1) 86,08% (GFAP) e 0% (MBP) nel non trattato a 100% nelle cellule trattate con Pioglitazone. Nelle cellule trattate si osserva anche un aumento dell'espressione dei marcatori di staminalità che raggiunge il 100%; la variazione risulta però statisticamente significativa solo per CD133. Per la linea G179 non si osservano variazioni significative né per l'espressione dei marcatori di staminalità né per l'espressione dei marcatori di differenziamento, ad eccezione di MBP la cui espressione aumenta del 100% nelle cellule trattate.

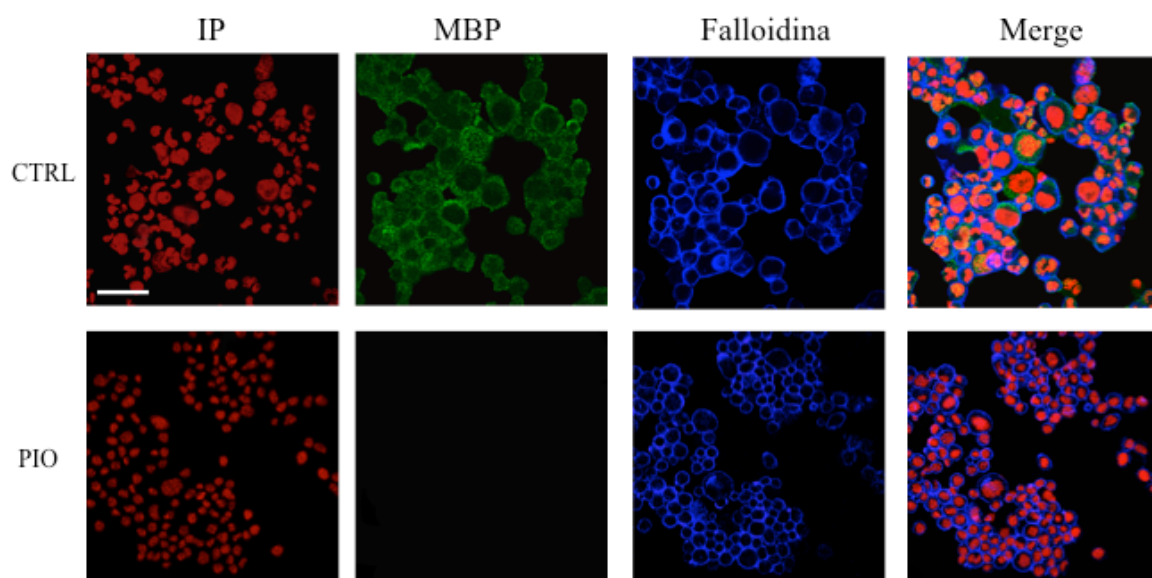
GBM04



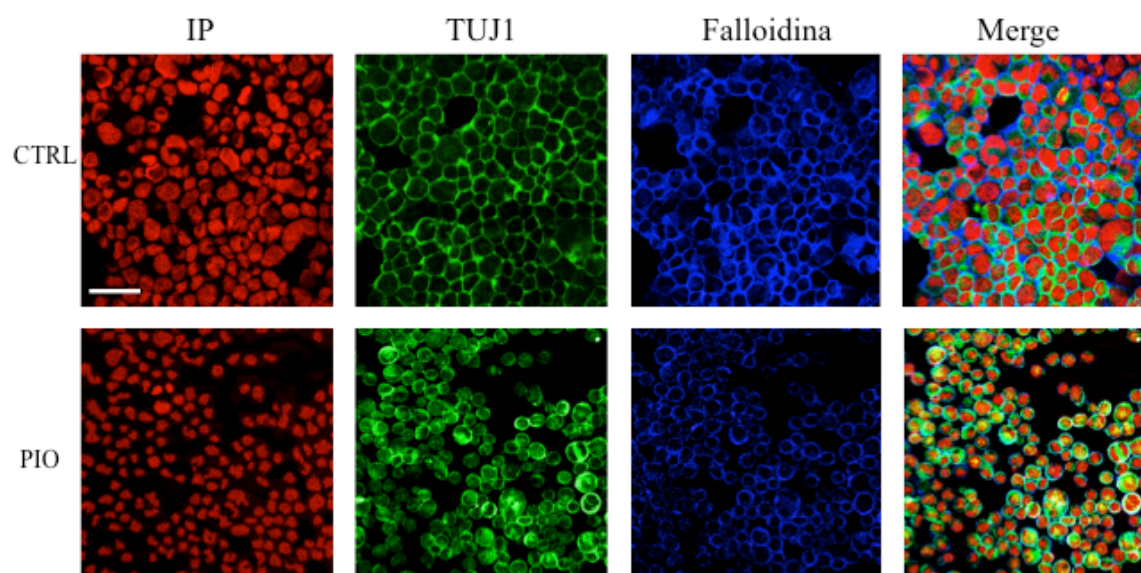
Glins2



G166



G179



GBM2

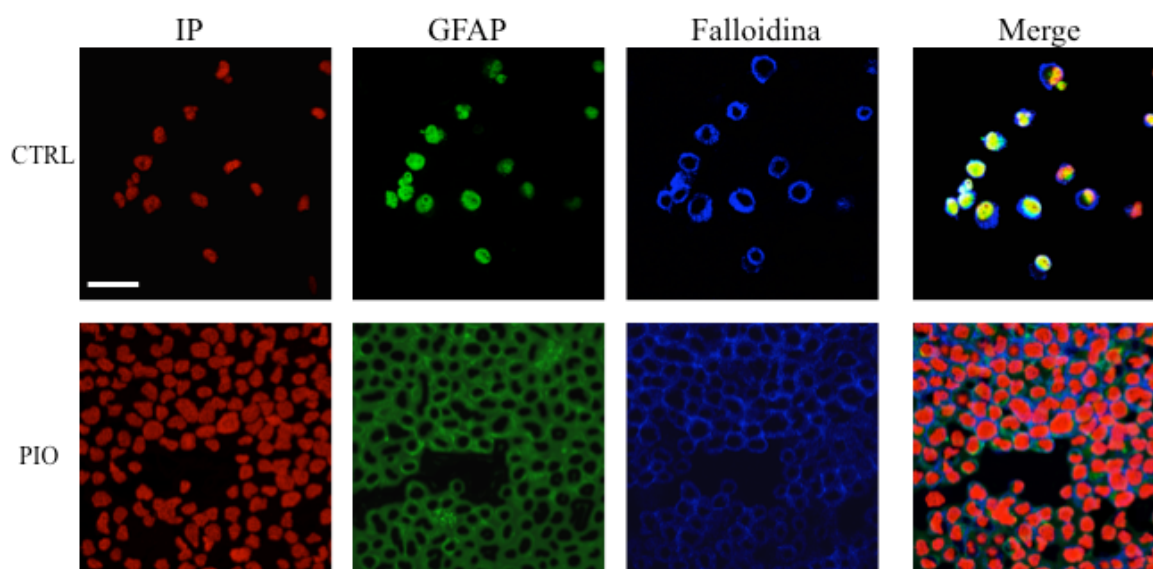


Figura 21. Immagini rappresentative dell'analisi di immunofluorescenza effettuata sulle sei linee di GSCs. Le immagini riportano esempi di espressione dei marcatori di staminalità Nestina e CD133 (qui riportati nelle linee GBM04 e GLINS2) e dei tre marcatori di differenziamento MBP, TUJ1 e GFAP (qui riportati nelle linee G166, G179 e GBM2). La barra corrisponde a 50 μ m.

		CD133		Nestina		TUJ1		GFAP		MBP	
		%	RANGE	%	RANGE	%	RANGE	%	RANGE	%	RANGE
GBM2	<i>Untreated</i>	62,96	++	75,44	++	19,27	-	63,81	++	100	+++
	<i>PIO 10μM 72h</i>	50	+	0***	-	0***	-	0***	-	0***	-
G144	<i>Untreated</i>	78,38	++	91,35	+++	45,79	+	82,46	+++	100	+++
	<i>PIO 10μM 72h</i>	100***	+++	100*	+++	100** *	+++	100***	+++	0***	-
G166	<i>Untreated</i>	7,34	-	78,3	++	25,92	-/+	83,9	+++	100	+++
	<i>PIO 10μM 72h</i>	0*	-	100** *	+++	100** *	+++	100***	+++	0***	-
GLINS2	<i>Untreated</i>	100	+++	79,63	+++	71,43	++	93,64	+++	100	+++
	<i>PIO 10μM 72h</i>	100	+++	0***	-	0***	-	16,2***	-	0***	-
GBM04	<i>Untreated</i>	86,29	+++	96,58	+++	76,78	++	86,08	+++	0	-
	<i>PIO 10μM 72h</i>	100***	+++	100	+++	100** *	+++	100***	+++	100***	+++
G179	<i>Untreated</i>	100	+++	99,17	+++	100	+++	98,21	+++	0	-
	<i>PIO 10μM 72h</i>	100	+++	100	+++	100	+++	100	+++	100***	+++

Tabella 3. Espressione di marcatori di staminalità e differenziamento neurale nelle sei linee cellulari di GSCs in risposta a trattamenti con PIO 10 μ M per 72 ore e significatività statistica rispetto ai campioni non trattati (* p<0,05; ** p<0,001; ***p<0,0001). Range: 0-20% $\rightarrow$ -; 20-40% $\rightarrow$ +/-; 40-60% $\rightarrow$ +; 60-80% $\rightarrow$ ++; 80-100% $\rightarrow$ +++.

3. VALUTAZIONE DEL POTENZIALE EFFETTO DEL PIOGLITAZONE SULL'INVASIVITÀ CELLULARE

3.1 EFFETTO DEL PIOGLITAZONE SULL'INVASIVITÀ CELLULARE

Per valutare se il Pioglitazone potesse influenzare la capacità di invasione cellulare delle sei linee di GSCs in studio è stato eseguito un saggio di chemiotassi, tramite il *Boyden Chamber Assay Kits (Cell Biolabs)*. Per ciascuna linea sono stati utilizzati due campioni: un campione non trattato e uno esposto per 48 ore ad una concentrazione di PIO di 10 μ M. Durante il periodo di incubazione le cellule con più alta capacità invasiva migrano, attratte per chemiotassi, rimanendo intrappolate nella membrana che separa la camera superiore da quella inferiore; al termine delle 48 ore le cellule intrappolate nel filtro sono state estratte e quantificate attraverso un saggio colorimetrico. L'immagine in Figura 22 mostra un esempio rappresentativo delle cellule colorate intrappolate nel filtro, prima dell'estrazione. I dati relativi alle linee trattate e ai rispettivi controlli sono espressi in termini di densità ottica (OD) [Fig.23].

Dai risultati ottenuti è possibile notare come, già in condizioni basali, le sei linee presentano una capacità invasiva differente; le linee G179, G144, GLINS2 e GBM2 mostrano una concentrazione maggiore di cellule in grado di attraversare la membrana, mentre le linee G166 e GBM04 sono caratterizzate da una capacità invasiva minore già nei controlli non trattati. Dopo trattamento con PIO si osserva una riduzione dell'invasività cellulare per le linee G166, GBM2, GliNS2 e G144, dove per quest'ultima addirittura si ha un dimezzamento del valore di partenza. Per le linee G179 e GBM04 si è osservato invece un aumento della motilità cellulare a seguito del trattamento con Pioglitazone 10 μ M. Questi dati, tuttavia, sono stati condotti in replica tecnica attraverso due misurazioni effettuate sullo stesso campione ma dovranno essere confermati da una replica biologica.

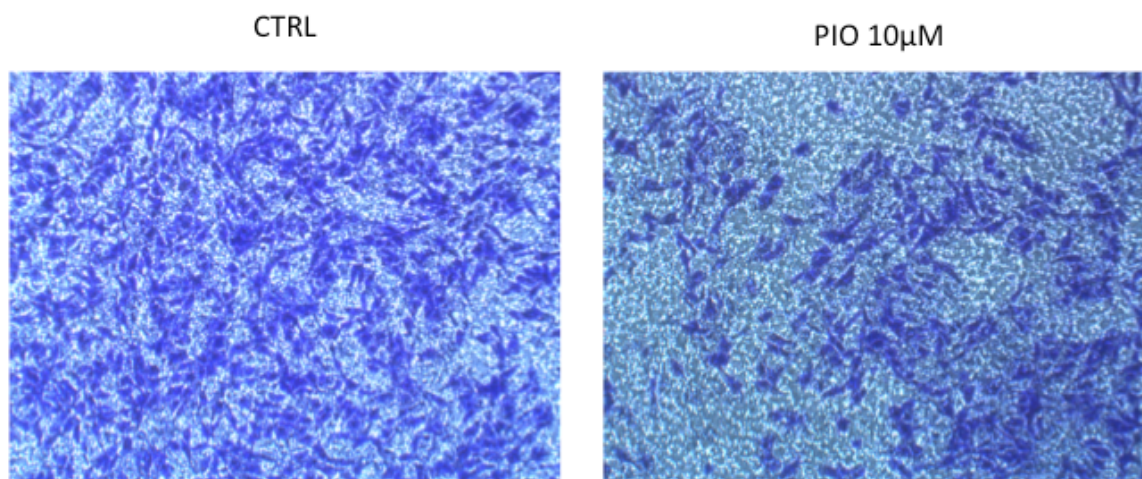


Figura 22. Immagini rappresentative del test di invasione effettuato tramite *Boyden Chamber Assay Kits* nella linea G144, non trattata e trattata con PIO 10µM PER 48 ore; le cellule qui riportate, dopo aver migrato, sono rimaste nel filtro e successivamente colorate.

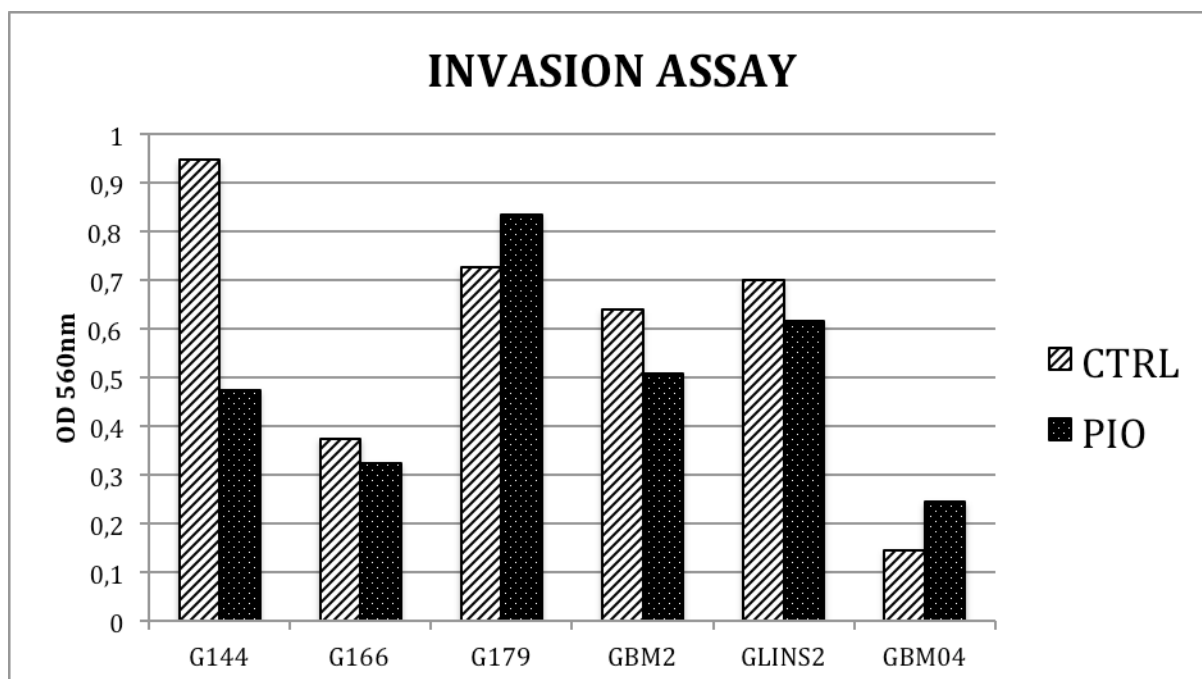


Figura 23. Gli istogrammi rappresentano i valori di OD 560nm per ciascuna linea non trattata e trattata con PIO 10µM; tali valori corrispondono alla concentrazione di cellule che sono state in grado di migrare attraverso la camera di Boyden.

3.2 EFFETTO DEL PIOGLITAZIONE SULL'ESPRESSIONE DI GENI DEL 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.

Evidenze in letteratura riportano una correlazione tra il *pathway* di Wnt e quello di PPAR γ (He, Chan et al. 1999, Jansson, Are et al. 2005) e un effetto del Pioglitazone sull'invasività cellulare tramite la modulazione dell'espressione della β catenina (Wan, Shi et al. 2011). A tal fine è stato eseguito uno studio di espressione, in particolare è stata effettuata un'analisi di RT-PCR su 5 geni appartenenti al *pathway* Wnt: WNT1, FZD4, CTNNB1, TCF7 e MYC, confrontando campioni di RNA provenienti da cellule non trattate con quelli derivanti da colture trattate con PIO 10 μ M per 96ore. La scelta dei geni da analizzare si è basata sull'importanza del processo in cui questi geni risultano coinvolti nei meccanismi di proliferazione e invasione cellulare. La quantificazione dell'espressione dell'mRNA di interesse, calcolata come $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold-change), ha permesso di evidenziare eventuali variazioni indotte dal Pioglitazone a carico dei geni in esame. È stato scelto il valore +/- 1,5 come *cut off* per il *fold regulation* e sono stati riportati in figura solo i valori considerati significativi poichè superano tale *cut off*.

Per due linee su sei, GBM04 e GLINS2, non si osserva alcuna variazione significativa nell'espressione dei geni selezionati coinvolti nel *pathway* di WNT; in questo caso, quindi, il Pioglitazone non sembrerebbe influenzare l'espressione e il funzionamento di questo *pathway* (Fig 24). Nelle restanti linee, invece, il trattamento con Pioglitazone determina delle variazioni significative in uno o più geni di WNT tra quelli selezionati per l'esperimento, ad indicare una possibile connessione tra questo *pathway* e quello di PPAR γ . In particolare, il trattamento con PIO ha determinato in due linee su sei, G144 e G179, una riduzione significativa del ligando WNT1; tuttavia, tale diminuzione non ha determinato una conseguente riduzione di espressione dei geni testati che si posizionano più a valle nella cascata di trasduzione del segnale di questo *pathway* molecolare e non è neppure accompagnata da una diminuzione del recettore correlato FZD4. Al contrario, nella linea G144, il gene CTNNB che codifica per β catenina, il principale effettore del *pathway* di WNT, è risultata *up-regolata* (Fig 24). Nella linea GBM2,

invece, si è osservato un aumento significativo dell'espressione di WNT1 accompagnato da un incremento dell'espressione di due geni a valle, TCF7 e MYC; TCF7 è un fattore trascrizionale che si lega a β catenina quando quest'ultima migra nel nucleo mentre MYC è un importante gene target di β catenina che risulta overespresso in molti tipi di tumore (Fig 24). La linea G166 ha mostrato una riduzione del solo gene TCF7 in seguito a trattamento farmacologico.

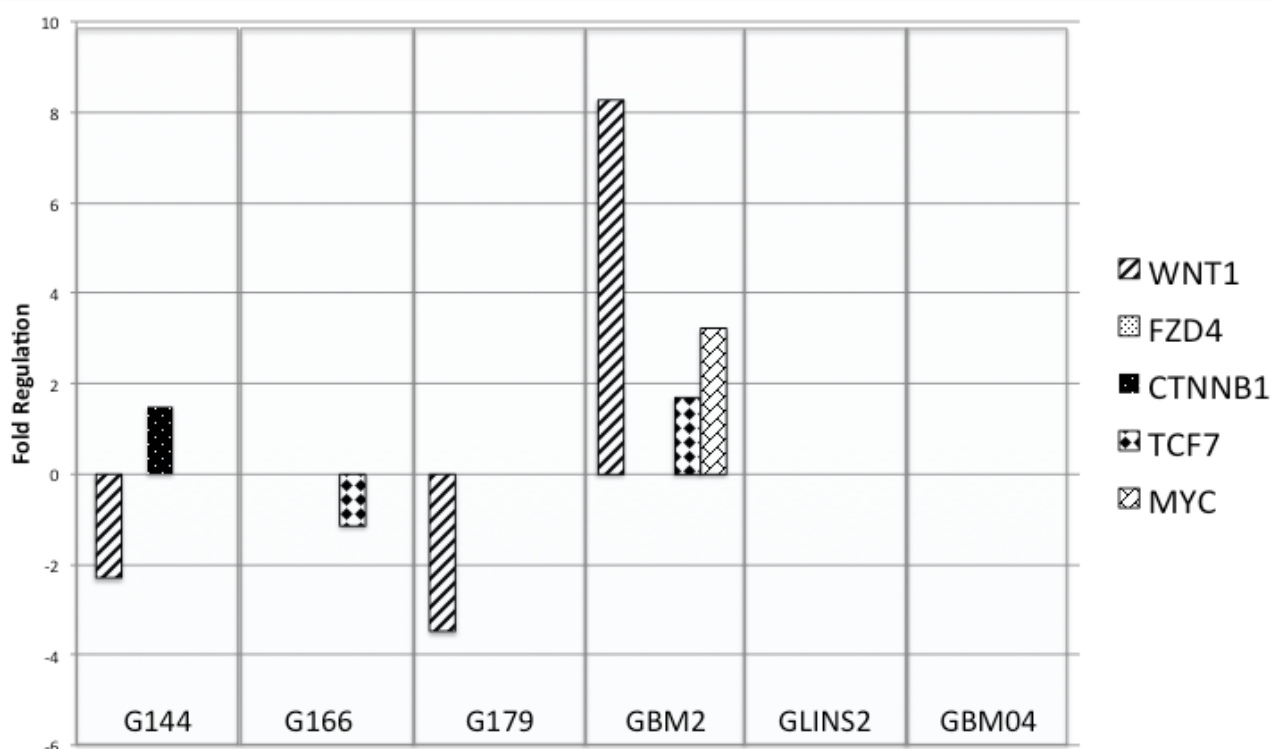


Figura 24. Gli istogrammi rappresentano le variazioni di espressione (cut off: fold regulation $> +1,5$ o $< -1,5$ i geni che non superano tale cut off non sono stati rappresentati) dei geni codificanti per cinque geni appartenenti al pathway di Wnt, nelle sei linee di GSCs in seguito a trattamento con PIO 10 μ M per 96h.

	G144	G166	G179	GBM2	GLINS2	GBM04
WNT1	-2,3105	1,015	-3,49	8,2726	1,169	-1,2662
FZD4	1,0872	-1,12	1,1588	1,2127	-1,017	1,1505
CTNNB1	1,4711	-1,2882	-1,0705	1,0245	-1,117	1,0219
TCF7	-1,3688	-1,147	-1,2487	1,6834	1,047	-1,0028
MYC	-1,0583	1,4521	-1,0519	3,2162	1,065	-1,0401

Tabella 4. Fold regulation dei geni appartenenti al pathway di Wnt in seguito a somministrazione di PIO 10 μ M per 96 ore nelle sei linee di GSCs in esame.

4. VALUTAZIONE DELLA POSSIBILE ATTIVAZIONE DI UNA VIA PPAR γ -INDIPENDENTE

4.1 EFFETTO DEL PIOGLITAZONE SULL'ESPRESSIONE DI GENI DEL PATHWAY DI PPAR γ

Dati in letteratura dimostrano il possibile effetto antitumorale di agonisti del *pathway* di PPAR γ tramite l'attivazione di una via indipendente dal *pathway* stesso (Thieringer, Fenyk-Melody et al. 2000, Ray, Akbiyik et al. 2006). Partendo da queste evidenze abbiamo deciso di valutare se il Pioglitazone agisse nelle nostre linee di GSCs tramite l'attivazione del *pathway* di PPAR γ oppure attraverso una via indipendente dal legame con il suo recettore. A tal fine è stata valutata, tramite RT-PCR, l'espressione di cinque geni appartenenti al *pathway* di PPAR γ (PPARG, EP300, CREBBP, TXNIP, FABP4) confrontando campioni di RNA provenienti da cellule non trattate con quelli derivanti da colture trattate con PIO 10 μ M per 96ore, in modo da indagare se l'azione dell' agonista del *pathway* avesse un effetto diretto o meno sull'espressione dei geni del *pathway* stesso. Anche in questo caso i geni sono stati scelti in base all'importanza del ruolo svolto sia all'interno del *pathway* che in meccanismi di crescita e propagazione tumorale, in particolare: PPARG che codifica per il recettore nucleare a cui si lega l'agonista, CREBBP e EP300 due cofattori reclutati in seguito all'attivazione del recettore, e TXNIP e FABP4 due geni a valle del *pathway* spesso coinvolti nella tumorigenesi.

Per la linea GBM04 non si osserva alcuna variazione significativa nei geni analizzati, suggerendo una possibile azione del PIO indipendente dal *pathway* di PPAR γ . Nelle restanti cinque linee è possibile osservare una modificazione nell'espressione di almeno un gene su cinque (Fig 25).

Per la linea G144 e GLINS2 si osserva una modificazione dell'espressione del solo recettore PPARG: per la prima si registra una riduzione significativa del recettore in seguito a trattamento con il suo agonista, mentre per la seconda linea si osserva un aumento dell'espressione del gene. Anche per la linea G166 si osserva un aumento dell'espressione del recettore in seguito a trattamento con PIO accompagnata da una riduzione significativa del gene target FABP4. Le linee GBM2 e G179 risultano essere le più sensibili al trattamento mostrando la variazione nell'espressione di, rispettivamente, due e tre geni su cinque. In particolare la linea

GBM2 ha mostrato una forte *over*-espressione del gene FABP4 insieme ad una riduzione del cofattore CREBBP. Mentre per la linea G179 si osserva un aumento nell'espressione dei due cofattori CREBBP ed EP300 in seguito a trattamento con PIO, associata ad una riduzione di FABP4.

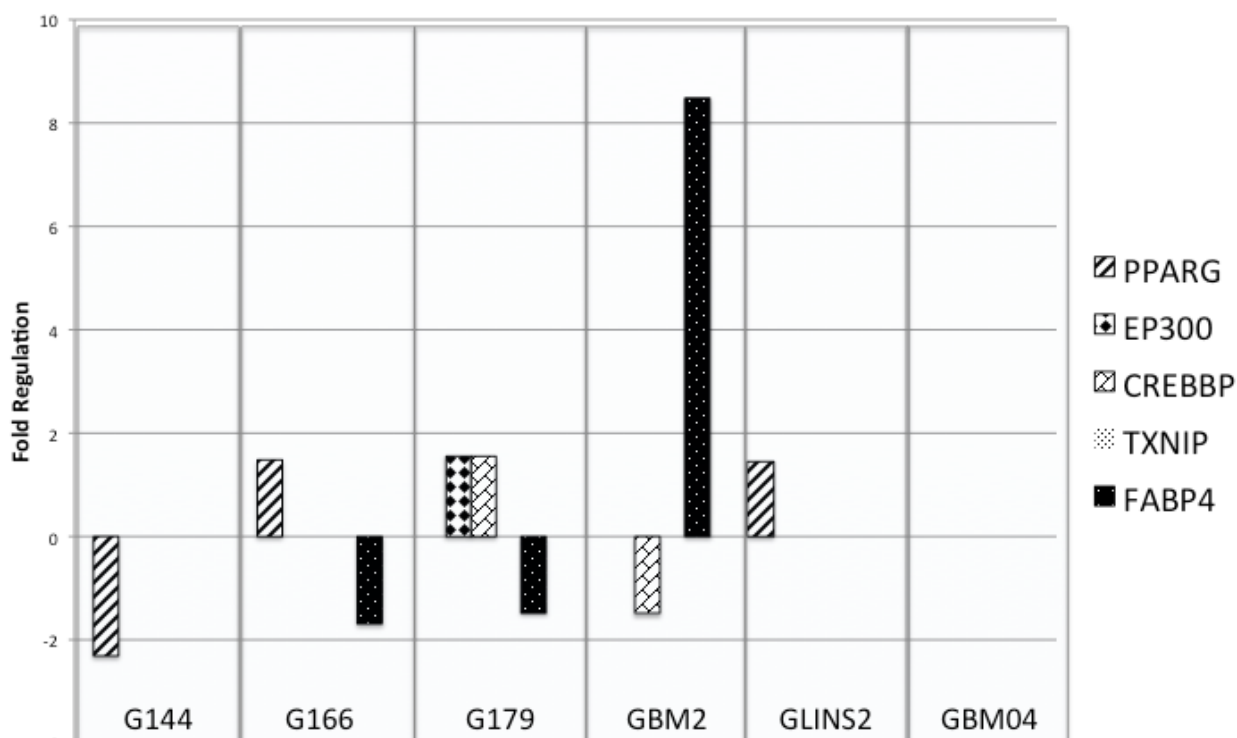


Figura 25. Gli istogrammi rappresentano le variazioni di espressione (cut off: fold regulation > +1,5 o < -1,5 i geni che non superano tale cut off non sono stati rappresentati) dei geni codificanti per cinque geni appartenenti al pathway di PPAR γ , nelle sei linee di GSCs in seguito a trattamento con PIO 10 μ M per 96h.

	G144	G166	G179	GBM2	GLINS2	GBM04
PPARG	-2,3119	1,4719	-1,1135	-1,3274	1,457	-1,0071
EP300	1,0908	1,0974	1,5611	-1,2276	-1,058	-1,077
CREBBP	1,2192	1,1723	1,5388	-1,4973	-1,05	1,1011
TXNIP	-1,1017	-1,0567	1,2792	1,2024	-1,079	-1,2009
FABP4	1,1091	-1,6932	-1,4698	8,4992	1,054	1,0894

Tabella 5. Fold regulation dei geni appartenenti al pathway di PPAR γ , in seguito a somministrazione di PIO 10 μ M per 96 ore nelle sei linee di GSCs in esame.

4.2 EFFETTO DELL' ANTAGONISTA, IN TRATTAMENTO SINGOLO E COMBINATO CON PIO, SULLA VITALITÀ CELLULARE

Per indagare ulteriormente la possibile attivazione di una via PPAR γ -indipendente da parte del Pioglitazone è stato scelto di testare un trattamento combinato di quest'ultimo con un antagonista del *pathway*, il GW9662 (GW). In particolare sono stati eseguiti saggi di attività metabolica, MTT, in cui è stato testato l'effetto del GW9662 singolarmente e in combinazione con il Pioglitazone. I *tests* sono stati effettuati in triplicato, in almeno due esperimenti indipendenti. In ogni prova è stato inserito un controllo (CTRL) non trattato, come riferimento. I dati di seguito riportati sono espressi come percentuale di sopravvivenza rispetto a tale CTRL. In questo test sono state saggiate, per il GW9662, concentrazioni crescenti del farmaco- 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M - a tempi di trattamento diversi 24, 48 e 72 ore. Nel trattamento combinato il Pioglitazone è stato usato a una concentrazione fissa di 10 μ M. Nel trattamento con l'antagonista GW9662, alle 24 e 48 ore, non si evidenzia nessun effetto significativo del farmaco sull'attività metabolica in tutte e sei le linee di GSCs, fatta eccezione per la linea GBM2 la cui riduzione è massima alla concentrazione di 5 μ M di GW, toccando il 70 e 80%, di vitalità rispettivamente alle 24 e 48 ore di trattamento[Fig.26]; per concentrazioni più alte di GW, invece, l'attività metabolica aumenta arrivando al 90% sia alle 24 che alle 48 ore [Tab.6]. A 72 ore di trattamento si registra una maggior dispersione delle linee in esame che rispondono in modo meno omogeneo. Le linee G144 e G166 sembrano essere resistenti al trattamento mostrando percentuali di vitalità che si mantengono sempre tra il 94 e i 105% [Fig.26]. La linea GBM04 mostra un andamento piuttosto discontinuo raggiungendo una sensibilità massima alla concentrazione di 5 μ M [Fig.26]. Per la linea G179 la vitalità arriva al 73% alla concentrazione più alta di GW mentre le GLINS2 mostrano una riduzione della vitalità a 5 e 10 μ M (74% e 77% rispettivamente) per poi risalire alla concentrazione più alta del farmaco (89%) [Fig.26]. La linea GBM2 risulta essere anche in questo caso la più sensibile al trattamento con GW9662 con un'attività metabolica che si riduce fino a raggiungere il 61,5 % per concentrazioni pari a 10 μ M, mentre aumenta per concentrazioni più alte [Fig.26].

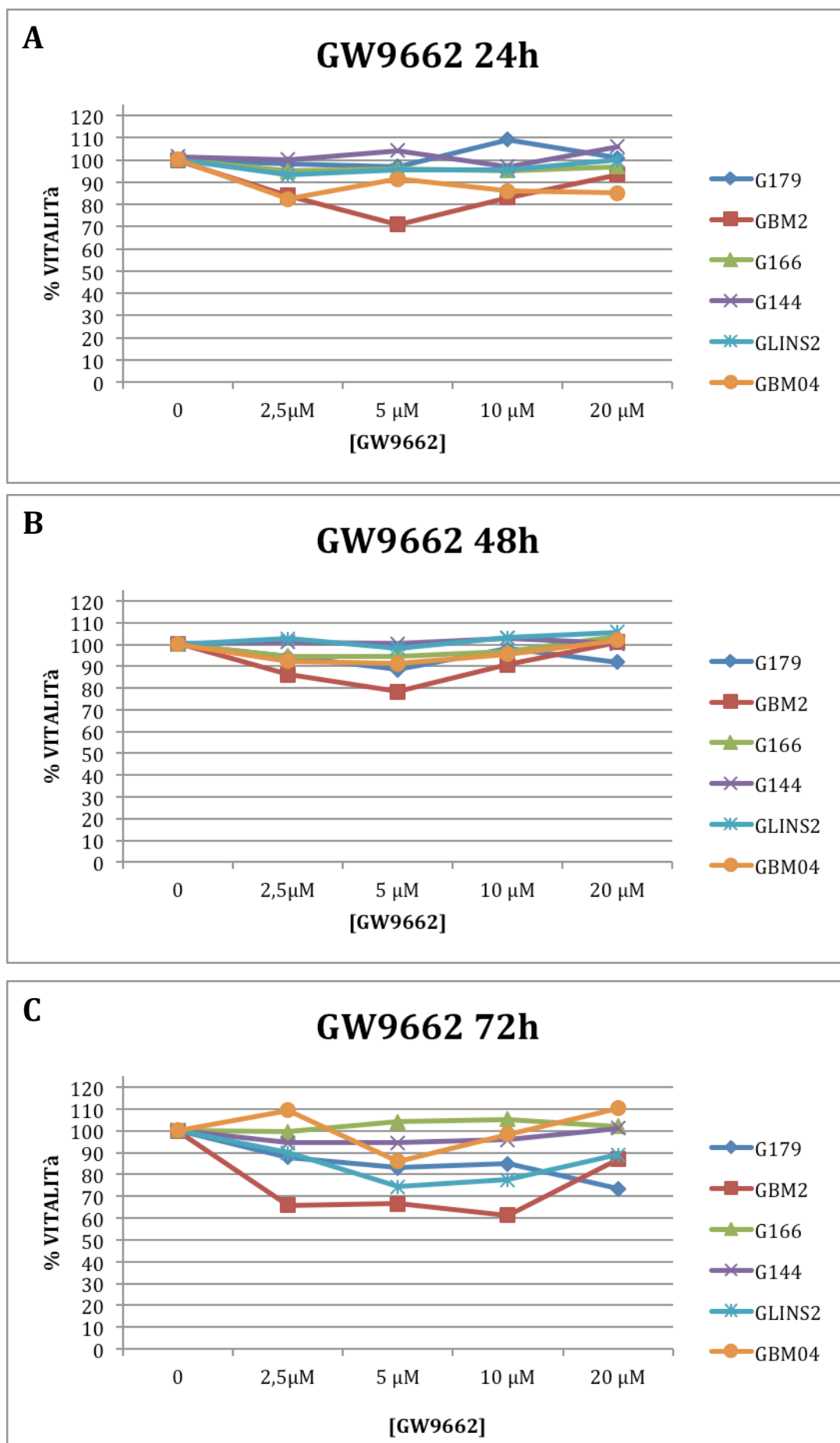


Figura 26. Variazioni della vitalità cellulare nelle linee di GSCs trattate con concentrazioni crescenti di GW9662 (2,5-5-10-20 μ M) per 24 (A), 48 (B) e 72 (C) ore. I dati sono derivati dalla media di due esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

24H	0	2,5µM	5 µM	10 µM	20 µM
G179	100,1123136	98,06648066	97,07440824	109,2187172	100,8268833
GBM2	100	84,19886516	71,08206094	83,27304985	93,70569291
G166	100,187512	94,96008135	95,73982905	95,11814512	97,01214171
G144	101,4287613	100,2857523	104,1135035	96,96305157	106,1802233
GLINS2	100,0643501	93,21733388	95,49583418	95,17408386	99,72888302
GBM04	100,0938694	82,50892074	91,1287762	85,82534499	85,11974961

48H	0	2,5µM	5 µM	10 µM	20 µM
G179	100,0863933	94,42963735	88,25452173	97,94504229	91,80432813
GBM2	100	86,1004835	78,07975965	90,68845911	100,8942085
G166	100,2595775	94,62793889	94,61152882	96,91639814	103,9667621
G144	100,2923977	100,8958567	100,2021899	102,7964415	100,3266144
GLINS2	100,0992063	102,6549145	98,4241453	103,0731074	105,7997558
GBM04	100,0839631	92,34766211	91,17906154	95,43846609	102,1752396

72H	0	2,5µM	5 µM	10 µM	20 µM
G179	100,150613	87,74696693	82,91486603	84,60458081	73,25866705
GBM2	100	65,85779697	66,58827539	61,4954212	86,85674757
G166	100,1292164	99,45383517	104,0620539	105,2152355	101,9172113
G144	100,2215301	94,39448441	94,49611043	95,73609405	101,2056209
GLINS2	100,0522466	89,85556717	74,16242889	77,56391501	88,89109486
GBM04	100,1471077	109,4580679	86,02316627	98,41763246	110,5370711

Tabella 6. Percentuali di vitalità cellulare riferite alla fig. I dati sono derivati dalla media di due esperimenti indipendenti condotti in triplicato. I dati statisticamente significativi sono colorati in grigio e sono stati identificati tramite *t test* ($p < 0,05$).

Per quanto riguarda il trattamento combinato con GW e PIO quello che si osserva è che tutte e sei le linee sembrano avere un comportamento più regolare e omogeneo.

Dopo 24 ore di trattamento si osserva una riduzione statisticamente significativa dell'attività metabolica solo per le linee GBM2 e GLINS2. Per la linea GBM2 la sensibilità al trattamento combinato si osserva già alle concentrazioni più basse di GW e si mantiene per le concentrazioni più alte; alla concentrazione di 10µM di GW, l'attività metabolica raggiunge il 60,5%. Per la linea GLINS2 l'attività metabolica è pari all'80% già alle concentrazioni più basse (GW 2,5µM) e si

mantiene costante anche alle concentrazioni maggiori. A 48 ore di trattamento l'andamento della vitalità delle sei linee in esame sembra più uniforme mostrando, in quasi tutti i casi, una riduzione dose-dipendente. Le linee GBM2 e GLINS2 sono tra le più sensibili anche se la GBM2 mostra una sensibilità al trattamento combinato inferiore rispetto alle 24 ore, in quanto l'attività metabolica raggiunge al massimo il 75% contro il 60,5% delle 24 ore [Fig.27-Tab.7]. Alle 48 ore si osserva una risposta significativa al trattamento combinato anche per le G144 e per le G179, la cui attività metabolica si riduce in maniera dose dipendente, rispettivamente con valori dell' 85,6% e 83% [Fig.27-Tab.7]. Dopo 72 ore di trattamento le linee sembrano suddividersi in due gruppi: GBM2 e GBM04 che mostrano una riduzione significativa della vitalità con percentuali che raggiungono il 56% in entrambi i casi (rispettivamente a 10 μ M e 20 μ M di GW); e G166, G144, G179 e GLINS2 che, al contrario, mostrano riduzioni che non scendono mai al di sotto dell'80% [Fig.27-Tab.7].

Per confermare l'azione del GW9662 è stato effettuato il calcolo del *cooperative index* che mostra, nella maggior parte dei casi, un effetto antagonista dei due farmaci in combinazione [Fig.28].

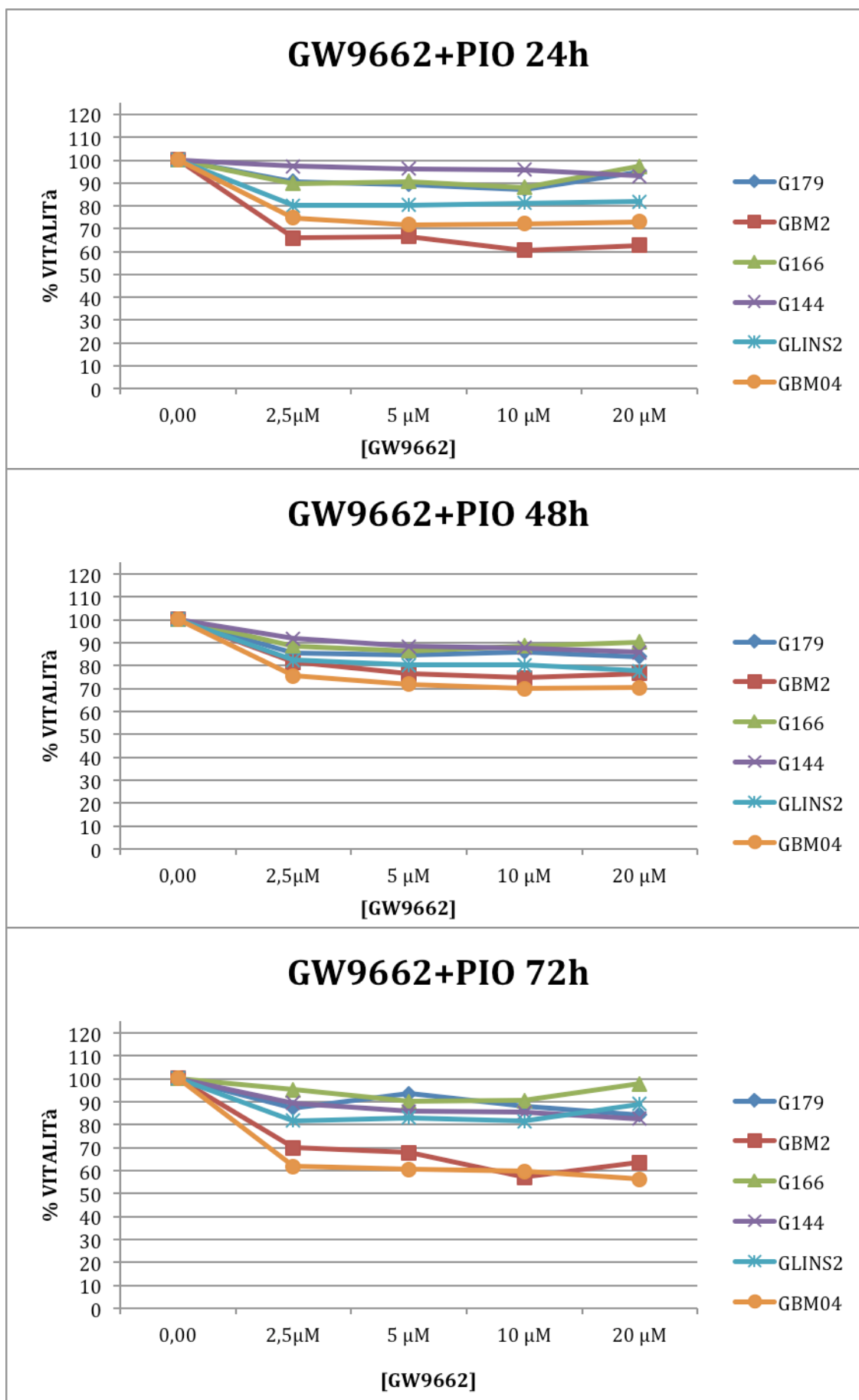


Figura 27. Variazioni della vitalità cellulare nelle linee di GSCs trattate con concentrazioni crescenti di GW9662 (2,5-5-10-20 μ M) in combinazione con PIO 10 μ M per 24 (A), 48 (B) e 72 (C) ore. I dati sono derivati dalla media di due esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

24h PIO10 $\mu\text{M}+$	0,00	2,5 μM	5 μM	10 μM	20 μM
G179	100,11	90,43	89,37	87,00	94,72
GBM2	100,11	65,87	66,53	60,51	62,58
G166	100,19	89,74	90,68	87,89	97,19
G144	100,10	97,17	96,04	95,71	92,92
GLINS2	100,07	80,07	80,23	80,99	81,72
GBM04	100,14	74,53	71,71	72,00	73,03

48h PIO 10 $\mu\text{M}+$	0,00	2,5 μM	5 μM	10 μM	20 μM
G179	100,09	85,26	84,53	85,86	83,78
GBM2	100,02	81,39	76,33	74,43	76,37
G166	100,26	88,55	86,43	88,62	90,13
G144	100,18	91,79	88,32	87,63	85,61
GLINS2	100,13	82,16	80,03	80,07	77,44
GBM04	100,18	75,33	71,70	69,76	70,26

72h PIO 10 $\mu\text{M}+$	0,00	2,5 μM	5 μM	10 μM	20 μM
G179	100,15	87,28	93,44	87,93	84,22
GBM2	100,03	69,69	67,57	56,92	63,27
G166	100,13	95,18	89,98	90,34	97,77
G144	100,18	89,27	85,69	85,20	82,54
GLINS2	100,12	81,60	82,82	81,33	88,87
GBM04	100,08	61,75	60,24	59,45	56,03

Tabella 7. Percentuali di vitalità cellulare riferite alla fig. I dati sono derivati dalla media di due esperimenti indipendenti condotti in triplicato. I dati statisticamente significativi sono colorati in grigio e sono stati identificati tramite *t test* ($p < 0,05$).

COOPERATIVE INDEX

CI 24h

PIO10 $\mu\text{M}+$	GW1 Mm	GW10 μM	GW30 μM	GW50 μM
G179	2,09	3,68	1,82	8,29
GBM2	0,73	1,50	0,43	0,62
G166	3,14	3,19	2,57	12,27
G144	-8,91	-3,70	-0,19	-1,16
GLINS2	0,54	0,84	1,16	1,02
VELOC1	1,24	1,00	2,35	2,49

CI<1 EFFETTO SINERGICO
CI=1 EFFETTO ADDITIVO
CI>1 EFFETTO ANTAGONISTA

CI 48h

PIO10 $\mu\text{M}+$	GW1 Mm	GW10 μM	GW30 μM	GW50 μM
G179	1,20	1,70	2,23	3,20
GBM2	1,37	1,99	1,44	1,19
G166	1,66	2,17	2,68	2,83
G144	1,62	1,86	1,62	1,56
GLINS2	0,13	0,50	0,79	0,39
VELOC1	0,36	0,48	1,10	0,93

CI 72h

PIO10 $\mu\text{M}+$	GW1 Mm	GW10 μM	GW30 μM	GW50 μM
G179	2,87	6,89	3,81	3,98
GBM2	1,94	2,39	1,78	1,51
G166	3,25	1,40	2,25	14,83
G144	0,53	0,68	0,59	1,38
GLINS2	0,26	1,17	1,41	1,08
VELOC1	0,18	1,24	1,12	0,80

Figura 28. Calcolo del Cooperative Index per stabilire se l'effetto dei due farmaci in combinazione fosse: sinergico (CI<1), additivo (CI=1) o antagonista (CI>1).

5. VALUTAZIONE DEI POTENZIALI EFFETTI ANTINEOPLASTICI DEL TRATTAMENTO COMBINATO CON PIOGLITAZIONE E ACIDO VALPROICO

Alla luce dei risultati ottenuti in due lavori riportati in letteratura, che mostrano l'efficacia della terapia combinata di acido valproico (VPA) e agonisti di PPAR γ sulla vitalità cellulare nell'ambito di diversi tumori (Aouali, Palissot et al. 2009, Koyama, Izutani et al. 2010), e partendo da risultati ottenuti in un lavoro precedentemente svolto nel nostro laboratorio che dimostra il potenziale prodifferenziativo del VPA sulle nostre linee di GSCs (Riva, Baronchelli et al. 2014), abbiamo deciso di valutare l'effetto del trattamento combinato con PIO e VPA sulle sei linee in esame.

Lo studio pregresso svolto nel nostro laboratorio, eseguito durante il mio lavoro di tesi di laurea magistrale, aveva appunto evidenziato, mediante analisi morfologica e IF, che dopo trattamento per 72 ore, 14 e 30 giorni con VPA 2 mM le cellule delle linee di GSCs in esame andavano incontro ad un differenziamento, riscontrato sia nell'osservazione di drastiche modificazioni della morfologia cellulare, sia nelle variazioni dei marcatori di staminalità e differenziamento (Riva, Baronchelli et al. 2014).

5.1 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO COMBINATO SULLA VITALITÀ CELLULARE

Al fine di valutare se, anche nelle nostre linee così come riportato in letteratura per altre linee cellulari tumorali, il trattamento combinato di PIO e VPA avesse un effetto citotossico maggiore rispetto al trattamento singolo, è stata effettuata un'analisi dell'attività metabolica tramite MTT *assay*. I dati di seguito riportati sono espressi come percentuale di sopravvivenza rispetto al controllo non trattato. Sono state testate concentrazioni crescenti di PIO (1-10-30-50 μ M) in combinazione con due concentrazioni di VPA (0,5 e 2mM) per 24, 48 e 72 ore di trattamento. I *tests* sono stati effettuati in triplicato, in almeno due esperimenti indipendenti. Infine, è stata effettuata un'analisi statistica sui dati grezzi tramite *t test*.

La tabella 8 e la figura 29 riportano i risultati ottenuti in tutte le analisi effettuate. In generale le due diverse concentrazioni di VPA non mostrano effetti significativamente diversi l'una dall'altra in combinazione con le concentrazioni crescenti di PIO.

Per la linea G179 si osserva una maggior efficacia del trattamento singolo con PIO a 24 ore che, alla concentrazione massima di farmaco, raggiunge il 50% di vitalità rispetto ai due trattamenti combinati che arrivano a 80% e 70%; al contrario, dopo 48 e 72 ore di trattamento la combinazione dei due farmaci determina una riduzione della vitalità maggiore rispetto al solo PIO, toccando percentuali di vitalità intorno al 60% e 50%. La linea GBM2 risulta essere, anche in questo caso, la linea più sensibile; in tutti e tre i tempi di trattamento la combinazione di PIO e VPA determina una riduzione della vitalità maggiore rispetto al solo PIO; a 48 e 72 ore di trattamento, alla concentrazione più alta di PIO, la vitalità dopo trattamento combinato raggiunge percentuali intorno a 36% (48h) e 40% (72h) rispetto alle 70% e 57% del solo PIO. Per la linea GBM04 si registra un'efficacia maggiore del trattamento singolo dopo 24 ore soprattutto a concentrazioni più alte di PIO (30 μ M e 50 μ M) dove quest'ultimo determina una riduzione che arriva al 48% di vitalità rispetto al 63/64% del combinato. Al contrario, prolungando il tempo di trattamento la combinazione di PIO e VPA risulta quasi sempre più efficace del trattamento singolo; questa differenza è maggiormente apprezzabile a 48 ore di trattamento dove a basse dosi di PIO (1 μ M e 10 μ M) si registra una vitalità che passa dal 99-95% del trattamento singolo a 77-68% del trattamento combinato fino ad arrivare al 52% rispetto al 70% alla concentrazione massima di PIO (50 μ M). Per quanto riguarda invece le linee GLINS2, G144 e G166 la differenza tra trattamento singolo e combinato sembra essere meno marcata e rilevante.

La linea GLINS2 a 24 ore di trattamento mostra una maggior efficacia del solo PIO alla concentrazione di 30 μ M; a 48 e 72 ore, invece, il trattamento combinato sembra più efficace con una differenza maggiore a concentrazioni più alte di PIO (30 μ M e 50 μ M). Per quanto riguarda la linea G144 si registra un'efficacia maggiore del trattamento singolo a 48 ore per tutte le concentrazioni di PIO mentre il trattamento combinato non sembra avere alcun effetto sulla vitalità cellulare; dopo 72 ore, al contrario, il trattamento con PIO+VPA determina una riduzione maggiore della vitalità cellulare soprattutto a 10 μ M e 30 μ M di PIO. La

linea G166 mostra una maggior efficacia del trattamento singolo dopo 24 ore con una percentuale di vitalità intorno al 70% mentre dopo 48 e 72 ore i tre trattamenti risultano piuttosto paragonabili.

A

VPA2mM+PIO:	1 μ M	10 μ M	30 μ M	50 μ M
G179	86,04765321	71,80553319	71,9431648	70,61668492
GBM2	70,70281124	67,14190094	74,1231593	68,21285141
G166	96,51496926	94,69059075	92,68410853	95,97032879
GBM04	91,03612479	92,17241379	70,08866995	64,45648604
Glins2	113,5220654	101,6829077	101,3048835	95,796931
G144	98,14233057	95,90209712	111,4845997	92,71173662

B

VPA2mM+PIO:	1 μ M	10 μ M	30 μ M	50 μ M
G179	66,28042104	66,03154451	61,5339661	64,68237175
GBM2	61,00266479	52,47865508	48,84203016	36,27423973
G166	85,16674159	81,63565838	74,01989602	59,64138742
GBM04	77,47614395	68,84518723	64,20048806	52,23393757
Glins2	108,8555313	100,260917	79,09570597	67,7845706
G144	94,2504533	86,98485114	96,06539159	101,9377669

C

VPA2mM+PIO:	1 μ M	10 μ M	30 μ M	50 μ M
G179	65,30112045	67,82212885	59,90896359	57,45798319
GBM2	58,96928854	52,48942892	50,94386877	42,72838459
G166	89,89416891	81,59628554	64,80021212	76,02487837
GBM04	67,98652589	64,00020111	67,38773253	75,15877325
Glins2	107,7491936	103,3639439	84,45226397	88,63868804
G144	90,16107056	77,07347932	74,30316302	75,53479319

Tabella 8. Percentuali di vitalità cellulare nelle sei linee di GSCs trattate con concentrazioni crescenti di PIO (1-10-30-50 μ M) in combinazione con VPA 2mM per 24(A), 48(B) e 72(C) ore. I dati sono derivati dalla media di due esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

MTT TRATTAMENTO COMBINATO PIO+VPA

— PIO — PIO+VPA 0,5mM — PIO+VPA 2mM

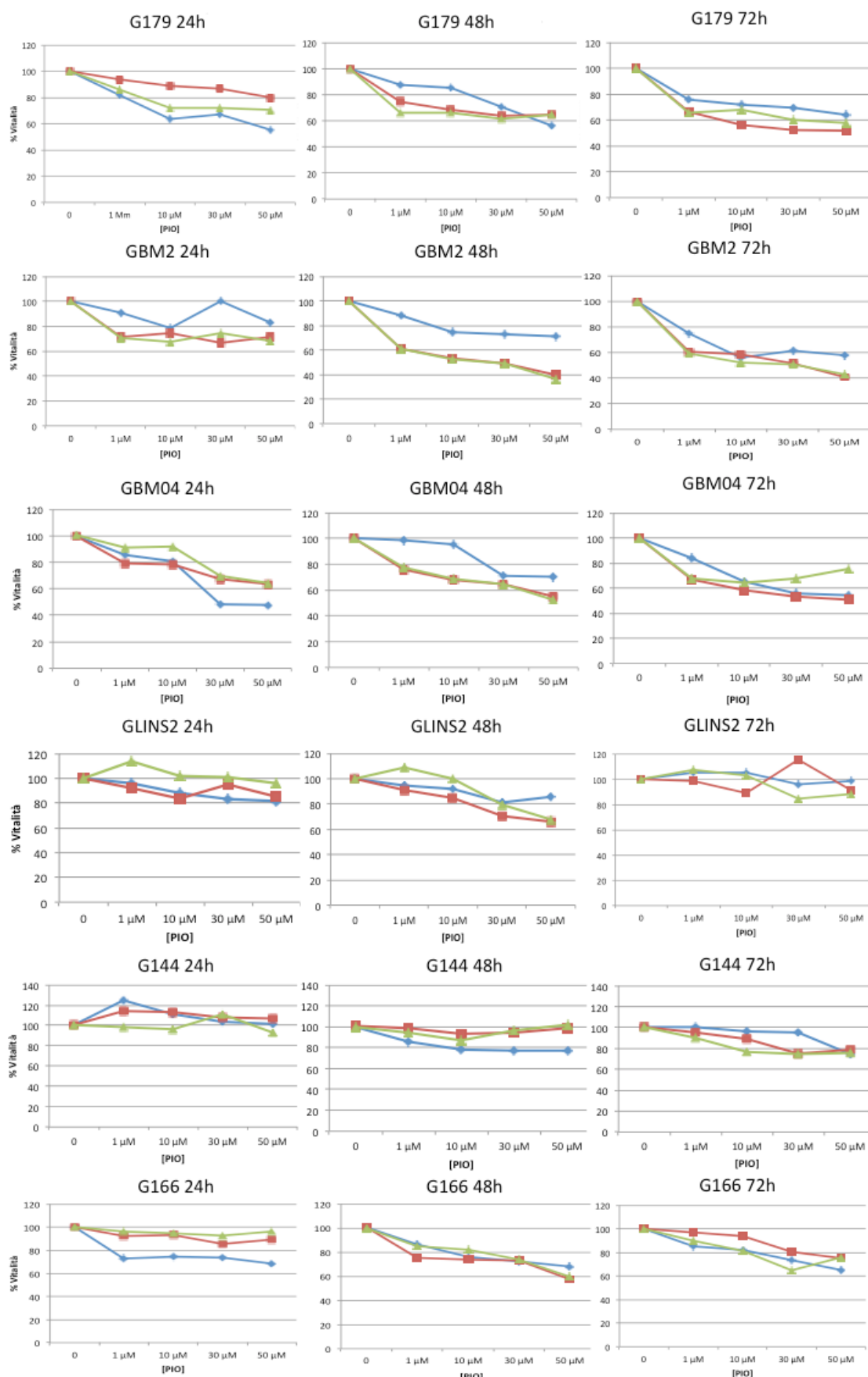


Figura 29. Variazioni della vitalità cellulare nelle sei linee di GSCs trattate con concentrazioni crescenti di PIO (1-10-30-50 μ M) in combinazione con VPA 0,5 E 2mM per 24, 48 e 72 ore. I dati sono derivati dalla media di due esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

5.2 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO COMBINATO SULL'INDICE MITOTICO

Al fine di analizzare la potenzialità del trattamento combinato di influenzare la proliferazione cellulare è stata effettuata un'analisi dell'indice mitotico. I test sono stati condotti in replica, in due esperimenti indipendenti, e per determinare se le differenze riscontrate rispetto al CTRL non trattato fossero o meno statisticamente significative, è stato eseguito il test del *Chi-quadro* (χ^2) stabilendo un valore limite di significatività pari a $p < 0,05$ (Tab.Suppl.7). Le diverse linee cellulari sono state esposte per 48 ore a trattamento con PIO 10 μ M in combinazione con VPA2mM già selezionata nei lavori precedenti come la concentrazione minima efficace (Riva, Baronchelli et al. 2014).

Il trattamento combinato determina in quattro linee su sei (GBM2, G166, G144 e GLINS2) una riduzione statisticamente significativa dell'indice mitotico. Per ognuna delle quattro linee in cui si verifica una riduzione significativa dell'indice mitotico dopo trattamento combinato, il numero di metafasi contate diminuisce notevolmente rispetto al trattamento singolo: per la linea GBM2 si passa da 72 metafasi contate dopo PIO a 35 dopo trattamento combinato, per la linea G166 da 189 a 95, nelle G144 si passa da 30 metafasi dopo PIO a 3 metafasi dopo PIO+VPA e nella linea GLINS2 da 134 a 17 (Fig.30).

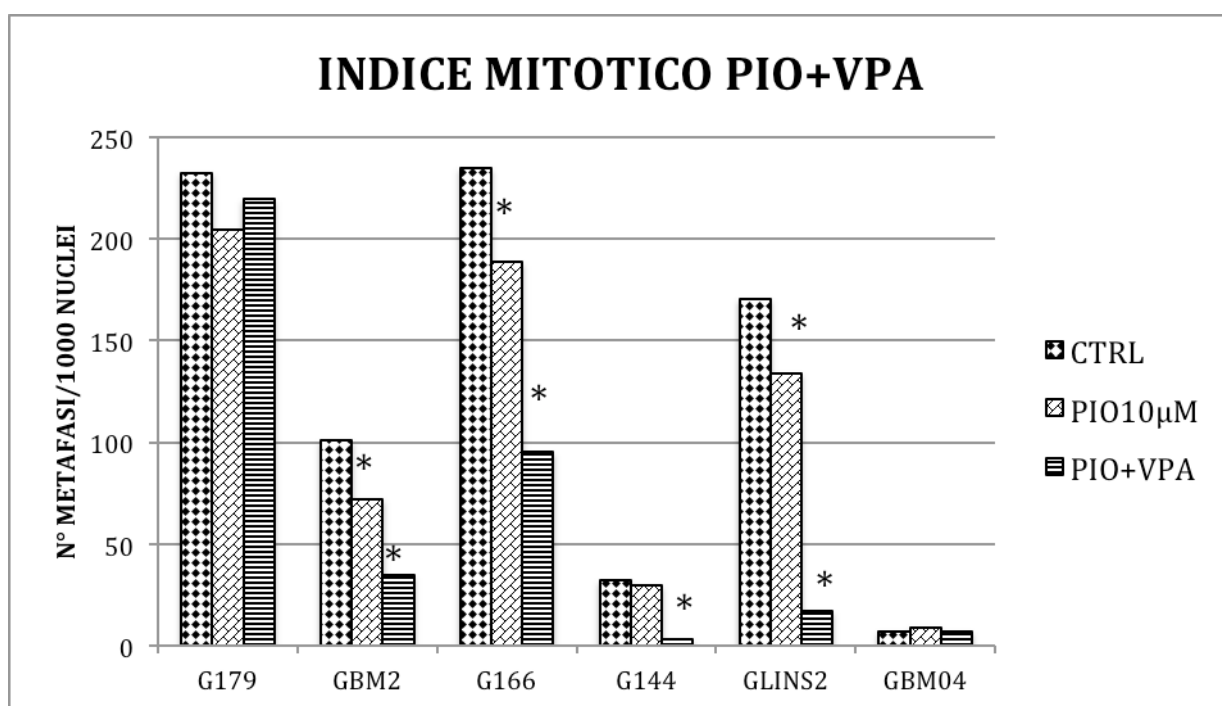


Figura 30. Gli istogrammi rappresentano l'indice mitotico di sei linee di GSCs, espresso come n° di metafasi su 1000 nuclei in percentuale. Tale analisi è stata eseguita su campioni di controllo non trattati e su campioni trattati con PIO 10 μ M (dati già riportati precedentemente) e PIO+VPA 2mM per 48 ore. L'analisi statistica è stata eseguita con test del Chi-quadro (χ^2) con correzione di Yates (* $p < 0,05$) 99

5.3 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO COMBINATO SULL'ESPRESSIONE DI MARCATORI DI STAMINALITÀ E DIFFERENZIAMENTO

A partire dai risultati ottenuti nel lavoro svolto precedentemente nel nostro laboratorio che dimostra un effetto pro-differenziativo del VPA sulle nostre linee di GSCs (Riva, Baronchelli et al. 2014) e vista l'incapacità del Pioglitazone da solo di determinare un chiaro effetto in questo senso, abbiamo deciso di valutare l'effetto del trattamento combinato di PIO 10 μ M e VPA 2mM per 72h sull'espressione di marcatori di staminalità e differenziamento tramite analisi di immunofluorescenza, come precedentemente descritto.

La tabella 9 riporta tutti i dati ottenuti nei diversi esperimenti, al fine di valutare meglio le eventuali differenze, in particolare: trattamento singolo con VPA (risultati che si riferiscono ad un lavoro antecedente a questo), trattamento con PIO (già riportati precedentemente nella tab.3) e trattamento combinato PIO+VPA,. Quello che si osserva è che in cinque linee su sei (G144, G166, GLINS2, GBM04 e G179) il trattamento singolo con PIO e il trattamento combinato PIO e VPA non si discostano molto per quanto riguarda le percentuali di espressione dei vari marcatori ma anzi, in quasi tutti i casi, i due trattamenti risultano identici. In particolare, le linee G144 e G179 mostrano lo stesso profilo di espressione dei cinque marcatori sia dopo trattamento con PIO che dopo trattamento combinato. Le linee G166 e GBM04 dopo trattamento combinato mostrano cambiamenti significativi rispetto al trattamento singolo solo per un marcatore: CD133 per la linea G166, che non era espresso in alcuna cellula dopo trattamento con PIO mentre è espresso nel 100% delle cellule dopo trattamento combinato; MBP nella linea GBM04, che passa dal 100% del trattamento singolo a 0% del trattamento combinato. Anche per quanto riguarda la linea GLINS2 non si evidenziano differenze significative nell'espressione dei cinque marcatori tra trattamento singolo e combinato. L'unica linea che sembra risentire in modo differente del trattamento combinato con PIO e VPA rispetto al solo trattamento con PIO, è la linea GBM2; dopo trattamento con PIO il 50% delle cellule esprimevano CD133 mentre tutti gli altri marcatori erano assenti, dopo trattamento combinato con PIO+VPA, invece, CD133 non è più espresso mentre il 14% delle cellule tornano ad esprimere TUJ1, anche se questa variazione, rispetto al controllo non trattato, non è statisticamente significativa.

	Treatment	CD133	Nestin	TUJ1	GFAP	MBP
		%	%	%	%	%
GBM2	<i>Untreated</i>	62,96	75,44	19,27	63,81	100
	<i>VPA 2 mM 72h</i>	56,48	53,77**	36,45*	64,81	94,96*
	<i>PIO 10µM 72h</i>	50	0***	0***	0***	0***
	<i>PIO+VPA 72h</i>	0***	0***	14	0***	0***
G144	<i>Untreated</i>	78,38	91,35	45,79	82,46	100
	<i>VPA 2 mM 72h</i>	67,86	87,85	13,79***	80,9	96,82
	<i>PIO 10µM 72h</i>	100***	100*	100***	100***	0***
	<i>PIO+VPA 72h</i>	100***	100*	100***	100***	0***
G166	<i>Untreated</i>	7,34	78,3	25,92	83,9	100
	<i>VPA 2 mM 72h</i>	1,92	53,77**	43,52*	81,31	100
	<i>PIO 10µM 72h</i>	0*	100***	100***	100***	0***
	<i>PIO+VPA 72h</i>	100***	100***	100***	100***	0***
GLINS2	<i>Untreated</i>	100	79,63	71,43	93,64	100
	<i>VPA 2 mM 72h</i>	55,5***	88,46	62,96	89,32	90,74**
	<i>PIO 10µM 72h</i>	100	0***	0***	16,2***	0***
	<i>PIO+VPA 72h</i>	88**	0***	0***	9,7***	0***
GBM04	<i>Untreated</i>	86,29	96,58	76,78	86,08	0
	<i>VPA 2 mM 72h</i>	100***	97,33	88,28***	44,17***	0
	<i>PIO 10µM 72h</i>	100***	100	100***	100***	100***
	<i>PIO+VPA 72h</i>	100***	100	100***	100***	0
G179	<i>Untreated</i>	100	99,17	100	98,21	0
	<i>VPA 2 mM 72h</i>	96,32	100	100	100	0
	<i>PIO 10µM 72h</i>	100	100	100	100	100***
	<i>PIO+VPA 72h</i>	100	100	100	100	100***

Tabella 9. Espressione di marcatori di staminalità e differenziamento neurale nelle sei linee cellulari di GSCs in risposta a trattamenti con VPA 2mM, PIO10 µM e trattamento combinato PIO+VPA per 72 ore; significatività statistica rispetto ai campioni non trattati (* p<0,05; ** p<0,001; ***p<0,0001).

5.4 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO COMBINATO SULL'ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NEL PATHWAY DI PPAR γ E DI WNT

Al fine di indagare in modo più approfondito l'effetto del trattamento combinato rispetto al trattamento singolo anche a livello molecolare, abbiamo esteso l'analisi di RT-PCR effettuata dopo trattamento con PIO anche alle sei linee trattate con PIO 10µM in combinazione VPA 2mM per 96 ore; anche in questo caso è stata valutata

la variazione di espressione di 5 geni appartenenti al *pathway* di PPAR γ (PPARG, EP300, CREBBP, TXNIP, FABP4) e 5 geni coinvolti nel *pathway* Wnt (WNT1, FZD4, CTNNB1, TCF7 e MYC).

In tutte e sei le linee, in seguito a trattamento combinato, si osserva una modificazione nell'espressione di almeno quattro geni su dieci e di almeno due su cinque per quanto riguarda il *pathway* di PPAR γ (Fig. 31). Rispetto al trattamento singolo con Pioglitazone si registra una variazione di espressione maggiore, in termini quantitativi, in moltissimi geni, con valori di *fold regulation* molto più elevati rispetto al trattamento singolo. La linea GBM04 che non mostrava variazioni significative in nessun gene in seguito al trattamento con PIO, mostra invece una modificazione nell'espressione di 5 geni su 10 in seguito a trattamento combinato; anche la linea GLINS2 che dopo trattamento con PIO mostrava il solo aumento dell'espressione del gene PPARG, in questo caso subisce una variazione nell'espressione di tutti e cinque i geni del *pathway* di PPAR γ .

Il dato più rilevante riguarda l'espressione del gene FABP4 che in tutte e sei le linee, in seguito a trattamento combinato, subisce un severo aumento dell'espressione, con valori di *fold regulation* che vanno da un minimo di 7 (GBM04) fino ad un massimo di 24 (G166 e G179).

Per quanto riguarda il gene PPARG questo risulta *down*-regolato, dopo trattamento combinato, nelle linee G144 e G179; mentre la linea G144 mostrava una riduzione nell'espressione di PPARG anche dopo trattamento con PIO, per la linea G179 non era stata registrata alcuna variazione significativa. Il trattamento combinato determina invece un aumento nell'espressione del gene PPARG nelle linee GLINS2 e GBM04 e quest'ultima non subiva alcuna variazione in seguito a trattamento singolo con PIO. Per quanto riguarda i geni appartenenti al *pathway* di Wnt, dopo trattamento combinato, si osserva un aumento nell'espressione del ligando WNT1 in tre linee su sei (G166, G179 e GBM04) e una riduzione nella sola linea G144. Il recettore FZD4 risulta *over*-espresso in quattro linee su sei (G144, G166, G179 e GBM04) dopo trattamento combinato mentre non subiva alcuna variazione significativa in seguito a trattamento con PIO in alcuna linea.

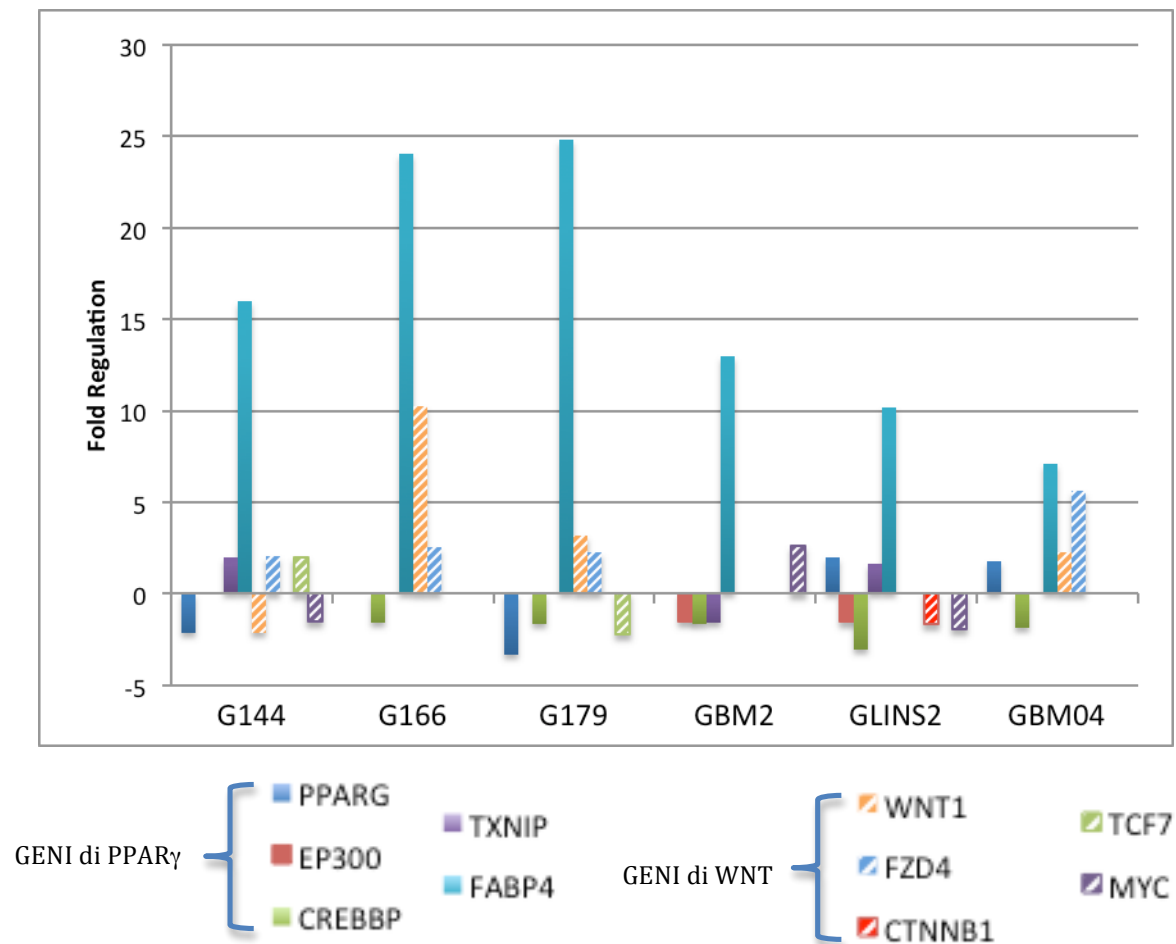


Figura 31. Gli istogrammi rappresentano le variazioni di espressione (cut off: fold regulation > +1,5 o < -1,5 i geni che non superano tale cut off non sono stati rappresentati) dei geni codificanti per cinque geni appartenenti al pathway di PPAR γ E cinque geni appartenenti al pathway di Wnt, nelle sei linee di GSCs in seguito a trattamento con PIO 10 μ M+ VPA 2mM per 96h.

	G144	G166	G179	GBM2	GLINS2	GBM04
PPARG	-2,1281	1,1808	-3,3379	-1,4306	2,0011	1,7717
EP300	1,0539	1,0927	-1,4074	-1,5159	-1,5515	-1,1359
CREBBP	-1,2378	-1,5842	-1,6802	-1,6305	-3,0369	-1,8674
TXNIP	1,9806	1,0395	-1,4751	-1,6009	1,6212	1,159
FABP4	15,9715	24,0591	24,8082	13,0034	10,1568	7,0801
WNT1	-2,1268	10,2374	3,1816	1,2508	1,1396	2,27
FZD4	2,0484	2,5482	2,2431	1,3713	1,1319	5,6298
CTNNB1	1,2864	1,171	-1,1275	1,148	-1,6908	-1,1688
TCF7	1,9521	1,0437	-2,228	1,0268	-1,0579	-1,0248
MYC	-1,5435	1,1146	1,3684	2,578	-1,951	-1,1588

Tabella 10. Fold regulation dei geni appartenenti al pathway di PPAR γ e al pathway di Wnt, in seguito a somministrazione di PIO 10 μ M+ VP 2mM per 96 ore nelle sei linee di GSCs in esame.

Discussione

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare i potenziali effetti antineoplastici del Pioglitazone, un agonista sintetico di PPAR γ (*peroxisome proliferator receptor gamma*), su sei linee di cellule staminali tumorali da GBM; tali linee sono già state caratterizzate nel nostro laboratorio (Baronchelli, Bentivegna et al. 2013) e successivamente trattate con farmaci con diverso meccanismo d'azione (Riva, Baronchelli et al. 2014).

È interessante notare come in letteratura siano riportati molti lavori che mostrano risultati eterogenei e spesso contrastanti circa il ruolo di PPAR-gamma in ambito oncologico. L'espressione di PPAR-gamma è stata descritta in una serie di neoplasie tra cui colon, polmone, prostata, vescica, mammella, duodeno e tiroide (Mueller, Sarraf et al. 1998, Sarraf, Mueller et al. 1999, Kroll, Sarraf et al. 2000, Mueller, Smith et al. 2000, Tsubouchi, Sano et al. 2000, Simula, Cannizzaro et al. 2010, Tseng and Tseng 2012). Un recente lavoro di Grommes e collaboratori ha mostrato come in pazienti diabetici con GBM trattati con agonisti di PPAR γ , è stato registrato un aumento della sopravvivenza media di 19 mesi rispetto a pazienti che avevano ricevuto il trattamento standard per il solo GBM, per i quali la sopravvivenza media è stata di soli 6 mesi (Grommes, Conway et al. 2010). Questo lavoro, in associazione con altri studi riportati in letteratura che hanno dimostrato che l'attivazione di PPAR γ , ad opera di agonisti naturali e sintetici, determina importanti effetti antitumorali nel GBM (Zang, Wächter et al. 2003, Liu, Zang et al. 2004, Chearwae and Bright 2008), hanno creato il razionale per questo lavoro. Uno degli effetti maggiormente riportati in letteratura degli agonisti di PPAR γ in cellule di glioma, è la riduzione della vitalità cellulare tramite induzione dell'apoptosi per blocco del ciclo cellulare (Zander, Kraus et al. 2002, Liu, Zang et al. 2004, Grommes, Landreth et al. 2006, Spagnolo, Grant et al. 2007, Chearwae and Bright 2008, Wan, Shi et al. 2011). Al fine di verificare l'eventuale effetto citotossico o citostatico del pioglitazone è stata effettuata un'analisi dell'attività metabolica sulle sei linee in esame, dopo somministrazione di PIO a concentrazioni crescenti per 24, 48 e 72 ore di trattamento. Quello che si osserva è che le sei linee mostrano una variabilità di risposta sia all'interno di uno stesso trattamento, a seconda delle concentrazioni di farmaco utilizzate, sia tra un tempo di trattamento e l'altro; questo aspetto sottolinea l'estrema variabilità che caratterizza le linee di GSCs che, a loro volta, riflettono l'eterogeneità tipica di questo tumore (Coons,

Johnson et al. 1995, Wiltshire, Rasheed et al. 2000, Denysenko, Gennero et al. 2014). Dai dati ottenuti è possibile identificare quattro linee che rispondono in modo più sensibile al trattamento farmacologico (GBM2, G179, G166 e GBM04) poiché mostrano una riduzione dell'attività metabolica significativa, soprattutto dopo 72 ore di trattamento; mentre le restanti due linee, GLINS2 e G144, sembrano essere più resistenti. Per chiarire l'effetto citotossico/citostatico del pioglitazone è stata effettuata un'altra analisi, il test del trypan blue, per valutare l'azione del farmaco sulla vitalità cellulare; il test effettuato su quattro linee (GBM2, G179, GLINS2 e G166) ha mostrato un aumento della mortalità cellulare per tre linee su quattro, G166, G179 e GLINS2, mentre la linea GBM2 non sembra risentire dell'effetto citotossico del PIO. L'effetto del pioglitazone, e di altri agonisti di PPAR α , sulla vitalità cellulare sembra essere mediato da meccanismi BAX-dipendenti, poiché spesso si registra l'*up*-regolazione di BAX, rilevata tramite un aumento dei livelli di proteina, in seguito ad attivazione di PPAR α (Zander, Kraus et al. 2002, Zang, Wächter et al. 2003, Liu, Zang et al. 2004, Grommes, Landreth et al. 2006). Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che la transfezione di cellule con oligonucleotidi anti-senso per BAX annullano l'effetto del trattamento con agonisti di PPAR α (Zander, Kraus et al. 2002). In alternativa, in seguito a trattamento con agonisti di PPAR α , è stata registrata la down-regolazione di BCL2 (Zang, Wächter et al. 2003, Liu, Zang et al. 2004). Alla luce di questi dati sarebbe interessante andare a valutare, in futuro, se e quali tra questi due meccanismi, BAX o BCL2, vengono coinvolti nell'induzione dell'apoptosi in seguito a trattamento con pioglitazone.

Una delle caratteristiche più importanti delle neoplasie è il loro vantaggio proliferativo rispetto al tessuto normale. Per determinare se il pioglitazone fosse in grado di influenzare la proliferazione cellulare nelle nostre linee di GSCs, per ciascuna delle sei linee in esame è stato calcolato l'indice mitotico, prima e dopo trattamento con PIO 10 μ M a 48 ore. Per tre linee su sei l'esposizione al farmaco ha determinato una riduzione statisticamente significativa della proliferazione cellulare (G166, GBM2 e GLINS2). Un possibile meccanismo mediante il quale gli agonisti di PPAR α possono inibire la proliferazione cellulare, consiste nell'induzione dell'arresto del ciclo cellulare nella fase G0/G1 (Zang, Wächter et al. 2003, Liu, Zang et al. 2004), e nella riduzione della percentuale di cellule che

entrano in fase S (Zang, Wächter et al. 2003, Liu, Zang et al. 2004). In accordo con questi risultati, sono anche stati rilevati bassi livelli di MYC a monte della transizione in fase S (Wan, Shi et al. 2011), nonché una possibile *down*-regolazione di CCND1 (ciclina D1) e delle chinasi ciclina-dipendenti associate (Wan, Shi et al. 2011). La diminuzione delle cellule che entrano in fase S in risposta ad agonisti PPAR è stata collegata anche ad una *up*-regolazione degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti CDKN1A, CDKN1B, e CDKN2B (Zang, Wächter et al. 2003, Liu, Zang et al. 2004). I risultati ottenuti dal calcolo dell'indice mitotico, un metodo economico e veloce, possono rappresentare un buon punto di partenza per andare ad indagare poi, in modo più approfondito, il meccanismo attraverso cui il pioglitazone agisce sulla proliferazione delle cellule in esame.

I risultati ottenuti in quest'ultima analisi ci permettono di confermare quanto ottenuto tramite MTT *assay*: da una parte mettono in evidenza l'effetto citotossico del farmaco nelle linee G166 e GLINS2, mentre dall'altra indicano un'azione citostatica del pioglitazone sulla linea GBM2 che mostra una riduzione dell'indice mitotico e dell'attività metabolica senza essere accompagnata da un' inibizione della vitalità cellulare.

Una delle vie attraverso cui PPAR α sembra regolare il differenziamento delle cellule staminali neurali è tramite l'induzione dell'espressione di geni di differenziamento (Kanakasabai, Pestereva et al. 2012, Pestereva, Kanakasabai et al. 2012) e l'inibizione di geni importanti per il mantenimento della staminalità (Kanakasabai, Pestereva et al. 2012, Pestereva, Kanakasabai et al. 2012). In alcuni lavori riportati in letteratura è stato dimostrato che agonisti di PPAR α determinano un aumento dell' espressione di marcatori tipici delle cellule gliali, in cellule tumorali T98G e DB29; in particolare il trattamento con agonisti quali ciglitazone e 15d-PGJ2, ha comportato un aumento dell'espressione di marcatori come GFAP (*glial fibrillary acid protein*) e TUJ1 (β III-tubulina), specifico per le cellule neuronali (Kanakasabai, Pestereva et al. 2012, Pestereva, Kanakasabai et al. 2012). 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, Bentivegna et al. 2013, Dela Cruz 2013).

Al fine di valutare se il pioglitazone potesse 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 pioglitazone a concentrazioni crescenti (1,10,30,50 μM) e per tempi di trattamento diversi (24, 48 e 72 ore). L'analisi non ha messo in luce evidenti e significativi cambiamenti nella morfologia cellulare in seguito a trattamento farmacologico, se non in pochi casi. Le cellule della linea G144 mostrano modificazioni solo dopo 24 ore di trattamento dove si osserva la comparsa di cellule con una morfologia fusiforme o poligonale rispetto ai controlli non trattati in cui le cellule formano aggregati sferici detti "neurosfe"; queste modificazioni, tuttavia, non vengono mantenute ai tempi di trattamento più lunghi. Lo stesso comportamento si osserva per la linea G166 che, in aggiunta, a concentrazioni alte di PIO (30 e 50 μM) e per tempi di trattamento più lunghi, risente dell'effetto citotossico del farmaco. La linea GLINS2 mostra un aumento nel numero delle estroflessioni cellulari, rispetto al controllo non trattato, solo ad alte concentrazioni di PIO somministrato per 48 e 72 ore. Per indagare in modo più approfondito, a livello molecolare, il potenziale pro-differenziativo del pioglitazone nelle nostre linee di GSCs, è stata effettuata un'analisi di immunofluorescenza sulle linee esposte per 72 ore a PIO 10 μM ed i rispettivi controlli non trattati, per andare a valutare eventuali variazioni nell'espressione di marcatori di staminalità e differenziamento. 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 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. I risultati ottenuti hanno evidenziato un dubbio effetto pro-differenziativo del pioglitazone sulle linee di GSCs in esame. Il trattamento con PIO, infatti, determina sulle diverse linee cellulari effetti differenti; in 3 linee su 6 (G144, G166 e GBM04) si osserva un contemporaneo aumento dell'espressione di 2 su 3 marcatori di differenziamento

esaminati e di 1 su 2 marcatori di staminalità. In 2 linee su 6 (GBM2 e GLINS2) il trattamento determina in entrambe una riduzione significativa dell'espressione del marcatore di staminalità Nestina oltre che una riduzione significativa dell'espressione di tutti e tre i marcatori di differenziamento; la linea G179 ha un comportamento a sé, non mostrando alcuna variazione significativa nelle percentuali di cellule esprimenti i marcatori di staminalità e differenziamento, se non MBP la cui espressione aumenta del 100% in seguito a trattamento farmacologico. In ogni caso ad un aumento dell'espressione dei marcatori di differenziamento non si associa anche una riduzione significativa dei marcatori di staminalità; laddove si osserva una riduzione di tutti e tre i marcatori di differenziamento, si osserva infatti anche una riduzione nell'espressione di uno dei marcatori di staminalità. Questi risultati non sono sufficienti, quindi, per stabilire e confermare quanto riportato in letteratura riguardo all'effetto pro-differenziativo di questo farmaco; una possibile spiegazione potrebbe essere data dalla probabile presenza di mutazioni eterogenee all'interno della popolazione cellulare che non permettono alle cellule di raggiungere un differenziamento terminale; inoltre il trattamento farmacologico potrebbe non essere abbastanza prolungato portando a fluttuazioni delle cellule tra diversi step o stadi di differenziamento, comunque reversibili.

Un altro importante effetto antitumorale degli agonisti di PPAR α riportato in letteratura è la capacità di ridurre l'invasività delle cellule di glioma nel tessuto locale (Grommes, Landreth et al. 2006, Papi, Tatenhorst et al. 2009, Wan, Shi et al. 2011). L' invasione delle cellule maligne nel tessuto cerebrale sano circostante, in pazienti GBM, può essere dovuta principalmente ad un'elevata espressione delle metalloproteinasi della matrice, MMP-2 e MMP-9, durante la progressione tumorale (Rao, Steck et al. 1993). In alcuni studi l'espressione di MMP-2 e MMP-9 è stata valutata prima e dopo la somministrazione di pioglitazone ed entrambi sono stati ritrovati *down-regolati* dopo l'esposizione al farmaco, suggerendo il ruolo degli agonisti PPAR α nel ridurre l'invasività di cellule di glioma (Grommes, Landreth et al. 2006, Papi, Tatenhorst et al. 2009, Wan, Shi et al. 2011).

Al fine di indagare anche questo aspetto del trattamento con pioglitazone nelle nostre linee, è stato effettuato un test di invasione cellulare tramite il *boyden chamber assay*. Le sei linee sono state sottoposte a trattamento con PIO 10 μ M per

48 ore e i risultati ottenuti sono stati confrontati con i relativi controlli non trattati. Per quattro linee su sei, G166, GBM2, GLINS2 e G144, è stata registrata una riduzione dell'invasività cellulare delle cellule trattate rispetto ai controlli mentre in due linee, G179 e GBM04, l'esposizione al farmaco ha determinato un aumento della capacità invasiva cellulare. Questi risultati sono stati affiancati ad un'analisi molecolare più specifica che aveva come scopo quello di indagare i livelli di espressione dei geni implicati nel pathway di Wnt che svolge un ruolo chiave nell'invasività cellulare. In particolare mutazioni a carico dei geni coinvolti in questo pathway potrebbero determinare l'alterazione dei processi di differenziamento, della regolazione del self-renewal e della migrazione cellulare (Cadigan and Liu 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 (Ying and Tao 2009, Foltz, Yoon et al. 2010). In questa tesi è stato eseguito uno studio di espressione per valutare se il PIO fosse in grado di condizionare l'espressione di geni coinvolti nel pathway di Wnt nelle nostre linee; è stato dimostrato infatti che, in cellule di glioma, il pioglitazone è in grado di indurre una riduzione dell'espressione di beta-catenina (CTNNB1) (Wan, Shi et al. 2011) 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 (Cadigan and Liu 2006, Sareddy, Panigrahi et al. 2009, Liu and He 2010, Liu, Tu et al. 2011). Inoltre CTNNB1 è in grado di controllare i livelli di espressione di CDH1 (E-caderina) responsabile dell'adesione cellulare (Wan, Shi et al. 2011). In questo studio è stata quindi valutata l'espressione di cinque geni appartenenti al pathway di Wnt: WNT1, FZD4, CTNNB1, TCF7 e MYC; l'analisi è stata effettuata confrontando i dati ottenuti dai campioni non trattati con quelli dei campioni trattati con PIO 10 μ M per 96 ore, in ciascuna delle sei linee di GSCs. Anche in questo caso i dati ottenuti mettono in luce la variabilità delle sei linee e in alcuni casi sembrano non confermare i dati riportati in letteratura. In due linee su

sei, GLINS2 e GBM04, il trattamento con pioglitazone infatti non determina alcuna variazione nell'espressione di nessuno dei cinque geni selezionati e in nessuna delle sei linee si evidenzia una riduzione dell'espressione di CTNNB1 dopo esposizione al farmaco. Le linee G144 e G179, dopo trattamento con PIO, mostrano una riduzione significativa del ligando WNT1 che è stato dimostrato essere over-espresso nei gliomi di III e IV grado (Zheng, Ying et al. 2010, Liu, Tu et al. 2011, Kaur, Chettiar et al. 2013). Uno studio recente di Kaur e collaboratori dimostra l'overespressione del ligando WNT1 in cellule, tessuti e cellule staminali di gliomi ad alto grado e mette in luce come l'inibizione del gene WNT1 tramite sh-RNA determini, in queste stesse cellule, importanti effetti sull' inibizione della proliferazione, riduzione dell'invasione cellulare e inibizione della tumorigenicità *in vivo* (Kaur, Chettiar et al. 2013). Questo studio mostra, inoltre, come l'inibizione del pathway tramite silenziamento di WNT1 determini una riduzione nei livelli di CTNNB1; questo dato non viene confermato nel nostro caso, ma addirittura in una delle due linee in cui si verifica una riduzione dell'espressione di WNT1, la G144, i livelli di espressione di beta-catenina aumentano. Inoltre, nella linea GBM2, lo stesso trattamento con PIO determina un innalzamento dei livelli di espressione di WNT1 seguito da un aumento di espressione dei geni TCF7 e MYC. La linea G166 mostra invece la sola riduzione del gene TCF7 in seguito a trattamento con PIO.

Un altro importante aspetto che siamo andati a valutare è la possibilità dell'attivazione, da parte del pioglitazone, di una via PPAR α -indipendente. Gli effetti indipendenti dei ligandi di PPAR α sono stati descritti per la prima volta nel 2000 da parte di Thieringer e collaboratori che hanno riportato gli effetti anti-infiammatori su monociti da sangue periferico del ligando naturale di PPAR α , 15d-PGJ2, tramite un meccanismo PPAR-indipendente (Thieringer, Fenyk-Melody et al. 2000). Un altro studio effettuato su cellule staminali embrionali murine e fibroblasti ha dimostrato l'effetto di agonisti di PPAR α sull'inibizione della crescita cellulare tramite l'attivazione di pathway indipendenti (Palakurthi, Aktas et al. 2001). Più di recente, è stata descritta la capacità di 15d-PGJ2 e ciglitazone di indurre l'apoptosi in Linfociti B normali e in cellule maligne tramite una indipendente da PPAR-gamma (Ray, Akbiyik et al. 2006). L'importanza e l'attenzione rivolte ai potenziali effetti dei ligandi di PPAR α tramite vie indipendenti, riguardano essenzialmente due motivi: 1) l'importanza di conoscere

anche gli effetti diretti dei ligandi di PPAR α , indipendentemente dal legame al recettore del pathway, nel caso di terapie basate sull'utilizzo di tali sostanze, in modo da poter valutare il loro meccanismo d'azione ed eventuali effetti collaterali; 2) ligandi di PPAR α con effetti PPAR-indipendenti possono essere utilizzati per identificare nuove vie metaboliche e pathway regolatori che svolgono un ruolo importante nei tumori e possono portare a nuovi utilizzi terapeutici di farmaci già esistenti. Abbiamo deciso quindi di indagare se, anche nel nostro caso, il pioglitazone fosse in grado di mostrare i suoi effetti non solo in seguito all'attivazione della via di PPAR α ma anche tramite una via indipendente dal suo legame con il recettore del pathway. Per raggiungere questo obiettivo abbiamo seguito due strade: la prima è stata quella di valutare l'effetto del pioglitazone, quale agonista di PPAR α , sull'espressione di cinque geni appartenenti al pathway canonico; la seconda consiste nell'utilizzo di un antagonista irreversibile del pathway, GW9662 (2-chloro-5-nitrobenzanilide), in un'analisi dell'attività metabolica delle linee in esame dopo trattamento singolo con l'antagonista e dopo trattamento combinato di quest'ultimo insieme al pioglitazone.

L'analisi di RT-PCR è stata effettuata su cinque geni appartenenti al pathway di PPAR α , in particolare abbiamo selezionato: PPARG, gene che codifica per il recettore a cui si lega il pioglitazone, in questo caso, o qualsiasi ligando di PPAR α ; EP300 e CREBBP due importanti cofattori reclutati in seguito all'attivazione del recettore; TXNIP e FABP4 due geni importanti per il loro ruolo nei processi di proliferazione cellulare, il primo, e nel trasporto nei ligandi di PPAR il secondo.

Tra le sei linee di GSCs testate la linea GBM04 è l'unica a non mostrare alcuna modificazione significativa nell'espressione dei geni appartenenti al pathway su cui il pioglitazone dovrebbe agire. Questo dato potrebbe suggerirci una possibile azione del farmaco in esame tramite una via indipendente dal pathway di PPAR α . Per quanto riguarda le altre linee, due su sei mostrano una modificazione solo nell'espressione del recettore: nella linea G144 una riduzione dell'espressione di PPARG e nella linea GLINS2 un aumento. Le linee GBM2 e G179 sembrano essere più sensibili al trattamento con pioglitazone mostrando variazioni rispettivamente in due (FABP4 e CREBBP) e tre geni (FABP4, CREBBP e EP300). In un recente lavoro Cataltepe e collaboratori hanno messo in luce un'espressione significativamente differente di FABP4 nel tessuto cerebrale normale, che non

esprime la proteina, rispetto a campioni provenienti da pazienti GBM che mostrano un'elevata espressione di FABP4; FABP4 è solitamente espresso in cellule endoteliali di molti tessuti normali dove è responsabile della proliferazione di tali cellule. Il fatto che questo gene sia stato trovato espresso nelle cellule di glioblastoma e non nel tessuto cerebrale normale suggerisce l'importante ruolo che questa proteina potrebbe giocare nella consistente angiogenesi tipica del GBM (Cataltepe, Arikan et al. 2012). È interessante notare come l'effetto del pioglitazone sull'espressione di questo gene sia differente nelle sei linee in esame; in due linee, G166 e G179, si verifica una riduzione significativa dell'espressione di FABP4 in risposta al trattamento farmacologico mentre nella linea GBM2 si osserva una forte *over*-espressione del gene.

Per indagare in modo più approfondito l'eventuale attivazione di una via PPAR γ -indipendente da parte del pioglitazone, è stato valutato l'effetto sulla vitalità cellulare del trattamento con un antagonista del pathway, GW9662, sia

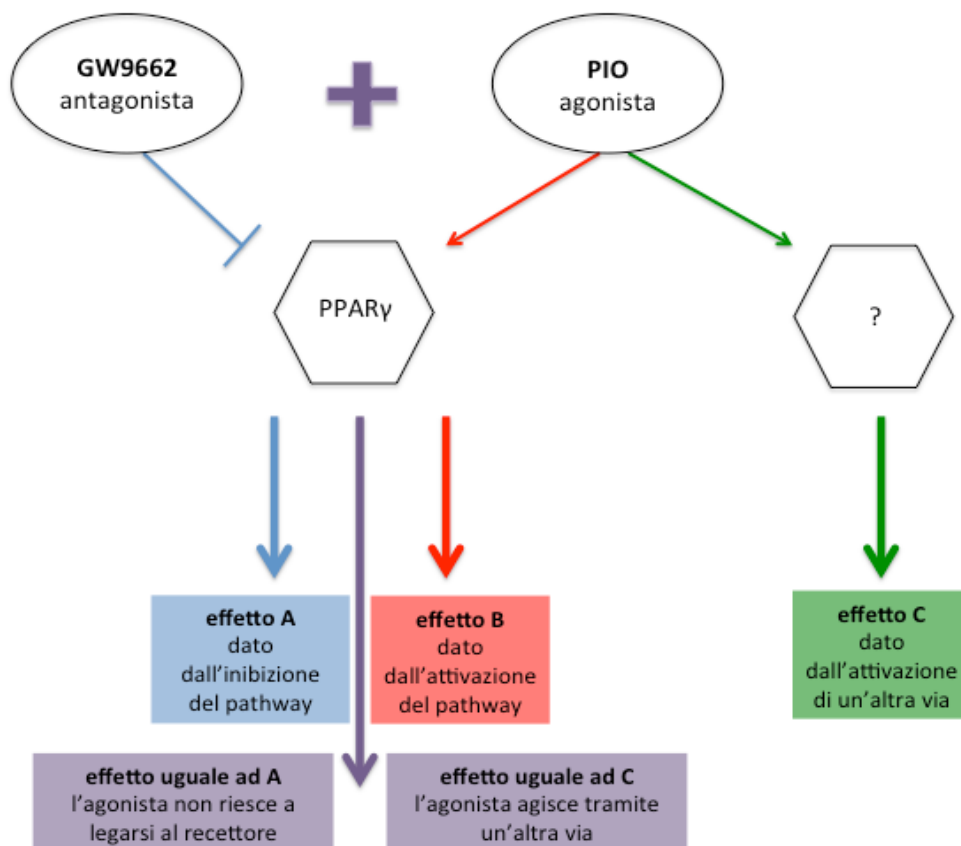


Fig. 32 Rappresentazione grafica delle possibili vie attivate in base agli effetti osservati sulla vitalità cellulare in seguito a somministrazione di PIO (rosso o verde), GW9662 (azzurro) e la combinazione dei due (viola).

singularmente che in combinazione con il PIO. Il GW9662 agisce legandosi e modificando in modo irreversibile il recettore PPAR γ determinando così l'impossibilità da parte del ligando, in questo caso del pioglitazone, di legarsi al recettore ed attivare la cascata di trasduzione del segnale a valle (Leesnitzer, Parks et al. 2002). La valutazione degli effetti sulla vitalità cellulare in seguito a trattamento con il solo agonista, PIO, il solo antagonista, GW9662, e la combinazione dei due, ci ha permesso di ipotizzare tre possibili scenari come rappresentato graficamente in figura 32. La somministrazione dell'antagonista nelle sei linee di GSCs per 24, 48 e 72 ore, non ha determinato molti effetti significativi sulla vitalità cellulare. La linea GBM2 è risultata, anche in questo caso, la più sensibile al trattamento con una riduzione significativa, dopo 72 ore, dell'attività metabolica fino ad un massimo del 61,5% con GW9662 10 μ M. L'altra linea che ha risentito del trattamento con antagonista è la linea GLINS2 che ha toccato percentuali di vitalità, dopo 72 ore di somministrazione, del 74% e 77% alle concentrazioni di 5 e 10 μ M. Le restanti linee sembrano essere resistenti al trattamento farmacologico con il solo GW9662 o, in alcuni casi, hanno mostrato riduzioni dell'attività metabolica che non sono risultate statisticamente significative. Avendo quindi dimostrato che il singolo trattamento con GW9662 non determina alcun effetto sulle linee in studio tranne in due (GBM2 e a seguire GLINS2), si è ipotizzato nel caso di sensibilità al trattamento combinato (PIO+GW9662, effetto uguale a C in fig. 32) un'azione del farmaco attraverso una via PPAR α -indipendente; nel caso in cui invece non si verifica sensibilità al trattamento combinato (effetto uguale ad A in fig. 32) ma solo al trattamento singolo con Pioglitazone, si è ipotizzato che il farmaco agisca attraverso il legame del suo recettore PPAR α . Il trattamento combinato dopo 24 ore determina riduzioni significative dell'attività metabolica nelle linee GBM2 e GLINS2; a 48 ore si aggiungono anche le linee G179 e G144 anche se con riduzioni che non vanno mai al di sotto dell' 83%. Dopo 72 ore si osserva una riduzione rilevante per le linee GBM2 e GBM04 e una riduzione meno elevata ma comunque significativa per la linea GLINS2. Poiché l'antagonista GW9662 da solo non ha mostrato effetti significativi sulla vitalità e poiché esso svolge la sua funzione legandosi al recettore modificandolo in maniera irreversibile, possiamo affermare che qualsiasi riduzione della vitalità cellulare osservata in seguito a trattamento combinato di

PIO+GW9662, sia dovuta all'azione del PIO tramite una via indipendente dal pathway di PPAR α ; per questo motivo possiamo ipotizzare che questo si verifichi nelle linee GBM2, GBM04 e GliNS2 mentre nelle restanti tre linee, G166, G144 e G179, sembrerebbe che l'agonista agisca tramite il legame al suo recettore. Queste ipotesi rappresentano solo un punto di partenza e saranno comunque da confermare e convalidare, tramite anche altri test più approfonditi.

Il laboratorio in cui ho svolto il mio progetto di dottorato si è occupato per molto tempo della valutazione dei potenziali effetti pro-differenziativi dell'acido valproico (VPA), un inibitore delle istone deacetilasi, nelle linee di cellule staminali tumorali da GBM. Questo studio, a cui ho partecipato durante il periodo di stage di tesi magistrale, ha portato ad importanti risultati che hanno messo in luce le potenzialità di questo farmaco per un eventuale utilizzo in una "terapia epigenetica" del GBM (Riva, Baronchelli et al. 2014). Questo studio pregresso è stato uno dei motivi che ci ha spinto a testare, nelle sei linee di GSCs in esame, il trattamento combinato di pioglitazone e acido valproico; un altro aspetto che ha giocato un ruolo importante nella scelta dello studio degli effetti di questo trattamento combinato, è dato da due lavori riportati in letteratura: uno dimostra come un ligando naturale di PPAR α in combinazione con VPA agiscano sinergicamente inducendo l'apoptosi di cellule di tumore del colon (Koyama, Izutani et al. 2010); il secondo mette in luce la capacità del pioglitazone di potenziare gli effetti del VPA in cellule di mieloma multiplo (Aouali, Palissot et al. 2009). Inoltre il trattamento singolo con VPA, così come il trattamento con solo PIO, hanno messo in luce l'incapacità di determinare un differenziamento terminale nelle linee in esame; per questo motivo l'associazione dei due farmaci potrebbe portare ad una spinta verso un processo di differenziamento meno reversibile.

A partire da tutte queste evidenze è stato valutato l'effetto del trattamento combinato, PIO10 μ M +VPA 2mM su: vitalità cellulare, indice mitotico, espressione di marcatori di staminalità e differenziamento e sull'espressione dei geni appartenenti al pathway di PPAR α e WNT, così come è stato fatto per il trattamento singolo. Il trattamento combinato ha dato risultati incoraggianti sia per quanto riguarda l'analisi della vitalità cellulare sia per quanto riguarda la proliferazione delle cellule in esame. Infatti, dall'analisi MTT si osserva una

maggior efficacia del trattamento combinato, rispetto al trattamento con solo PIO, in tre linee su sei, G179, GBM2 e GBM04, in cui la vitalità raggiunge valori decisamente più bassi rispetto al trattamento singolo; nelle restanti tre linee invece, GLINS2, G144 e G166, la differenza tra trattamento singolo e combinato sembra essere meno marcata e rilevante. L'analisi della proliferazione cellulare tramite valutazione dell'indice mitotico ha messo in luce una riduzione notevole del numero di metafasi dopo trattamento combinato in quattro linee su sei (GBM2, G166, G144 e GLINS2); la diminuzione è risultata decisamente maggiore dopo trattamento con PIO+VPA rispetto al solo trattamento con PIO. Il lavoro svolto in precedenza ha permesso di mettere in luce come l'esposizione delle cellule delle linee di GSCs al VPA abbia indotto in alcune di esse un differenziamento preferenziale verso specifici lineages neurali; per questo motivo è stato scelto di valutare se la combinazione di PIO e VPA potesse avere effetti positivi anche sul differenziamento delle linee in esame, proprio perché, al contrario, il trattamento singolo con pioglitazone non ha portato a risultati significativi per quanto riguarda questo aspetto. In cinque linee su sei (G144, G166, GLINS2, GBM04 e G179) l'analisi di immunofluorescenza non ha però mostrato differenze rilevanti tra i dati ottenuti dopo trattamento singolo con PIO e dopo trattamento combinato PIO+VPA; l'unica linea che sembra risentire in maniera differente del trattamento combinato è la GBM2, che mostra una riduzione dell'espressione del marcatore di staminalità CD133 maggiore dopo PIO e VPA in combinazione rispetto al trattamento singolo con PIO. L'efficacia del trattamento combinato PIO+VPA è stata testata anche andando a valutare eventuali variazioni nell'espressione dei cinque geni appartenenti al pathway di PPAR α e i cinque appartenenti al pathway di WNT già indagati nel trattamento singolo con PIO. Questo aspetto è stato studiato soprattutto in virtù della capacità del VPA di influenzare il *chromatin remodelling* mediante la modulazione dell'attività di alcune classi di istone deacetilasi, e ipotizzando quindi una capacità nel condizionare l'espressione di geni coinvolti in questi due pathway. Tale farmaco, infatti, influenzando direttamente sui livelli di acetilazione istonica e indirettamente sul grado di metilazione del DNA, potrebbe modificare l'espressione genica, ristabilendo la corretta regolazione dei meccanismi coinvolti nel mantenimento della staminalità, nel differenziamento e nella migrazione cellulare; la combinazione dei due farmaci potrebbe quindi

portare ad un effetto maggiore sull'espressione genica rispetto a quello ottenuto nel trattamento singolo con PIO. L'analisi ha determinato in tutte e sei le linee di GSCs in esame una modificazione nell'espressione di almeno quattro geni sui dieci totali dei due pathway e di almeno due geni su cinque appartenenti al pathway di PPAR γ . La variazione dell'espressione è maggiore anche in termini quantitativi, dopo trattamento combinato, in moltissimi geni, con valori di *fold regulation* molto più elevati rispetto al trattamento singolo. Non è detto però che questi risultati siano sempre da intendersi come "positivi" ma è necessario discriminare a seconda del gene che varia; per esempio uno dei dati più rilevanti riguarda la forte over-espressione del gene FABP4, che, come detto in precedenza, è risultato over-espresso nel GBM rispetto al tessuto cerebrale normale (Cataltepe, Arikan et al. 2012). Allo stesso modo, se andiamo a valutare i cambiamenti di espressione indotti dal trattamento combinato nei geni appartenenti al pathway di WNT, possiamo osservare un aumento di espressione del ligando WNT1 in tre linee su sei, G166, G179 e GBM04, e una riduzione dello stesso gene nella sola linea G144; anche questo gene, in alcuni studi presenti in letteratura come riportato in precedenza, è stato dimostrato essere over-espresso nei gliomi.

Il trattamento combinato con PIO e VPA determina, quindi, effetti positivi nelle nostre linee di GSCs per quanto riguarda l'aspetto citotossico, mentre non sembra determinare effetti antineoplastici importanti per quanto riguarda il differenziamento cellulare. I risultati ottenuti incoraggiano in ogni caso un approfondimento di questo trattamento andando a valutare anche altri aspetti importanti nella tumorigenesi e nella progressione tumorale.

Questo studio rappresenta l'inizio di un lavoro che ha come scopo la delucidazione dei possibili effetti antineoplastici del pioglitazone su cellule staminali tumorali da GBM, poiché l'effetto di questo trattamento non è mai stato valutato su questo tipo di cellule. I risultati ottenuti devono essere considerati, quindi, come un punto di partenza utile ed incoraggiante per capire come procedere in futuro al fine di studiare in modo più approfondito l'effetto di questo farmaco nell'ambito della terapia del GBM, tenendo in considerazione sia l'elevata variabilità di risposta tipica delle linee di staminali tumorali da GBM, sia il meccanismo d'azione ancora poco chiaro del pioglitazone in ambito oncologico.

Supplementi

24H	1µM	10 µM	30 µM	50 µM
G179	0,017557471	0,003413955	0,00018118	1,4715E-07
GBM2	0,297386396	0,036898169	0,891566516	0,031362884
G166	0,231892513	0,243508836	0,257679321	0,183606948
GBM04	0,221845969	0,189565922	0,00016158	0,000107931
GLINS2	0,032082527	3,30876E-05	3,14548E-07	2,1339E-07
G144	7,24881E-08	0,000240587	0,280663279	0,583177888

48H	1µM	10 µM	30 µM	50 µM
G179	0,156371332	0,078375767	0,002252174	0,000114083
GBM2	0,018457784	2,0809E-05	4,05514E-05	8,59578E-06
G166	0,000566087	0,000436535	0,000385149	1,38911E-06
GBM04	0,89738209	0,77725063	0,202756727	0,196838846
GLINS2	0,064802681	0,030399338	6,37677E-05	0,000267836
G144	0,000692495	3,82609E-05	4,3843E-05	1,55027E-05

72H	1µM	10 µM	30 µM	50 µM
G179	0,005130218	0,001556808	0,001310877	0,000411746
GBM2	0,013143359	9,93822E-05	0,000127977	0,00112433
G166	0,000978643	0,000615212	0,000184412	4,14292E-05
GBM04	0,135687329	0,010052001	0,003084706	0,0013419
GLINS2	0,120561106	0,075712092	0,377234282	0,626708485
G144	0,969850498	0,533338441	0,530888541	0,003624353

Tab Suppl. 1. P-value ottenuti tramite *t-test* riferiti alle variazioni della vitalità cellulare nelle linee di GSCs trattate con concentrazioni crescenti di PIO (1-10-30-50 µM) per 24, 48 e 72h.

GBM2	PIO 10 uM	PIO 30 uM
48h	0,339201304	0,431846627
72h	0,05577323	0,015280719
G166		
48h	0,2089	0,4822
72h	0,945912031	0,869936579
G179		
48h	0,39140152	0,102487392
72h	0,929885022	0,524608059
GLINS2		
48h	0,055496462	0,10989123
72h	0,876957287	0,273083011

Tab Suppl. 2. P-value ottenuti tramite *t-test* riferiti alle variazioni della mortalità cellulare ottenute tramite test del trypan blue nelle linee di GSCs trattate con concentrazioni crescenti di PIO 10 e 30 µM per 48 e 72h.

	G179	GBM2	G166	G144	GLINS2	GBM04
CTRL	232,5	101	235	32	170,5	7
PIO10 μ M	204,5	72	188,5	29,5	134	9

Tab Suppl. 3. Numero di metafasi contate su 1000 nuclei, prima e dopo trattamento con PIO 10 μ M per 48h. I *test* sono stati condotti in replica, in due esperimenti indipendenti e qui è stata riportata la media dei due.

	G144	G166	G179	GBM2	GLINS2	GBM04
CTRL	80,3	50,25	25	27,15	4,95	23,5
PIO10 μ M	70,5	43,15	34,15	22,65	7	24,8

Tab Suppl. 4. Percentuali relative ai nuclei polimorfici contati su 1000 nuclei normali, prima e dopo trattamento con PIO 10 μ M per 48h. I *test* sono stati condotti in replica, in due esperimenti indipendenti e qui è stata riportata la media dei due.

G179	0,7948
GBM2	0,0118
G166	0,1437
G144	0,0259
GLINS2	0,0293
GBM04	0,7885

Tab Suppl. 5. P-value ottenuti tramite test del Chi-Quadro riferiti alle variazioni dei nuclei polimorfici ottenute nelle linee di GSCs trattate con PIO 10 μ M per 48 ore.

G144	0,0000
G166	0,0228
G179	0,0017
GBM2	0,0000
GLINS2	0,0517
GBM04	0,5307

Tab Suppl. 6. P-value ottenuti tramite test del Chi-Quadro riferiti alle variazioni dell'indice mitotico ottenute nelle linee di GSCs trattate con PIO 10 μ M per 48 ore.

G144	0,0000
G166	0,0000
G179	0,4870
GBM2	0,0000
GLINS2	0,0000
GBM04	0,7885

Tab Suppl. 7. P-value ottenuti tramite test del Chi-Quadro riferiti alle variazioni dell'indice mitotico ottenute nelle linee di GSCs trattate con PIO 10 μ M+ VPA 2mM per 48 ore.

Bibliografia

Ahmad, I. M., N. Aykin-Burns, J. E. Sim, S. A. Walsh, R. Higashikubo, G. R. Buettner, S. Venkataraman, M. A. Mackey, S. W. Flanagan, L. W. Oberley and D. R. Spitz (2005). "Mitochondrial O₂⁻ and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells." *J Biol Chem* **280**(6): 4254-4263.

Ahn, S. and A. L. Joyner (2005). "In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog." *Nature* **437**(7060): 894-897.

Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. Clarke (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3983-3988.

Aouali, N., V. Palissot, V. El-Khoury, E. Moussay, B. Janji, S. Pierson, N. H. Brons, L. Kellner, M. Bosseler, K. Van Moer and G. Berchem (2009). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists potentiate the cytotoxic effect of valproic acid in multiple myeloma cells." *Br J Haematol* **147**(5): 662-671.

Bao, S., Q. Wu, S. Sathornsumetee, Y. Hao, Z. Li, A. B. Hjelmeland, Q. Shi, R. E. McLendon, D. D. Bigner and J. N. Rich (2006). "Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor." *Cancer Res* **66**(16): 7843-7848.

Bar, E. E., A. Chaudhry, A. Lin, X. Fan, K. Schreck, W. Matsui, S. Piccirillo, A. L. Vescovi, F. DiMeco, A. Olivi and C. G. Eberhart (2007). "Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma." *Stem Cells* **25**(10): 2524-2533.

Baronchelli, S., A. Bentivegna, S. Redaelli, G. Riva, V. Butta, L. Paoletta, G. Isimbaldi, M. Miozzo, S. Tabano, A. Daga, D. Marubbi, M. Cattaneo, I. Biunno and L. Dalprà (2013). "Delineating the cytogenomic and epigenomic landscapes of glioma stem cell lines." *PLoS One* **8**(2): e57462.

Becher, O. J., D. Hambardzumyan, E. I. Fomchenko, H. Momota, L. Mainwaring, A. M. Bleau, A. M. Katz, M. Edgar, A. M. Kenney, C. Cordon-Cardo, R. G. Blasberg and E. C. Holland (2008). "Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas." *Cancer Res* **68**(7): 2241-2249.

Behin, A., K. Hoang-Xuan, A. F. Carpentier and J. Y. Delattre (2003). "Primary brain tumours in adults." *Lancet* **361**(9354): 323-331.

Bondy, M. L., M. E. Scheurer, B. Malmer, J. S. Barnholtz-Sloan, F. G. Davis, D. Il'yasova, C. Kruchko, B. J. McCarthy, P. Rajaraman, J. A. Schwartzbaum, S. Sadetzki, B. Schlehofer, T. Tihan, J. L. Wiemels, M. Wrensch, P. A. Buffler and B. T. E. Consortium (2008). "Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium." *Cancer* **113**(7 Suppl): 1953-1968.

Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nat Med* **3**(7): 730-737.

Cadigan, K. M. and Y. I. Liu (2006). "Wnt signaling: complexity at the surface." J Cell Sci **119**(Pt 3): 395-402.

Calabrese, C., H. Poppleton, M. Kocak, T. L. Hogg, C. Fuller, B. Hamner, E. Y. Oh, M. W. Gaber, D. Finklestein, M. Allen, A. Frank, I. T. Bayazitov, S. S. Zakharenko, A. Gajjar, A. Davidoff and R. J. Gilbertson (2007). "A perivascular niche for brain tumor stem cells." Cancer Cell **11**(1): 69-82.

Carro, M. S., W. K. Lim, M. J. Alvarez, R. J. Bollo, X. Zhao, E. Y. Snyder, E. P. Sulman, S. L. Anne, F. Doetsch, H. Colman, A. Lasorella, K. Aldape, A. Califano and A. Iavarone (2010). "The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours." Nature **463**(7279): 318-325.

Cataltepe, O., M. C. Arikian, E. Ghelfi, C. Karaaslan, Y. Ozsurekci, K. Dresser, Y. Li, T. W. Smith and S. Cataltepe (2012). "Fatty acid binding protein 4 is expressed in distinct endothelial and non-endothelial cell populations in glioblastoma." Neuropathol Appl Neurobiol **38**(5): 400-410.

Chalmers, A. J. (2007). "Radioresistant glioma stem cells--therapeutic obstacle or promising target?" DNA Repair (Amst) **6**(9): 1391-1394.

Chearwae, W. and J. J. Bright (2008). "PPARgamma agonists inhibit growth and expansion of CD133+ brain tumour stem cells." Br J Cancer **99**(12): 2044-2053.

Chen, R., M. C. Nishimura, S. M. Bumbaca, S. Kharbanda, W. F. Forrest, I. M. Kasman, J. M. Greve, R. H. Soriano, L. L. Gilmour, C. S. Rivers, Z. Modrusan, S. Nacu, S. Guerrero, K. A. Edgar, J. J. Wallin, K. Lamszus, M. Westphal, S. Heim, C. D. James, S. R. VandenBerg, J. F. Costello, S. Moorefield, C. J. Cowdrey, M. Prados and H. S. Phillips (2010). "A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma." Cancer Cell **17**(4): 362-375.

Choe, G., S. Horvath, T. F. Cloughesy, K. Crosby, D. Seligson, A. Palotie, L. Inge, B. L. Smith, C. L. Sawyers and P. S. Mischel (2003). "Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo." Cancer Res **63**(11): 2742-2746.

Cinat, J., M. Scholz, P. H. Driever, D. Henrich, H. Kabickova, J. U. Vogel, H. W. Doerr and B. Kornhuber (1996). "Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells." Anticancer Drugs **7**(7): 766-773.

Clarke, I. D. and P. B. Dirks (2003). "A human brain tumor-derived PDGFR-alpha deletion mutant is transforming." Oncogene **22**(5): 722-733.

Clement, V., P. Sanchez, N. de Tribolet, I. Radovanovic and A. Ruiz i Altaba (2007). "HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity." Curr Biol **17**(2): 165-172.

Collins, A. T., P. A. Berry, C. Hyde, M. J. Stower and N. J. Maitland (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." Cancer Res **65**(23): 10946-10951.

- Coons, S. W., P. C. Johnson and J. R. Shapiro (1995). "Cytogenetic and flow cytometry DNA analysis of regional heterogeneity in a low grade human glioma." Cancer Res **55**(7): 1569-1577.
- Costello, J. F., C. Plass, W. Arap, V. M. Chapman, W. A. Held, M. S. Berger, H. J. Su Huang and W. K. Cavenee (1997). "Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA." Cancer Res **57**(7): 1250-1254.
- Cullingford, T. E., K. Bhakoo, S. Peuchen, C. T. Dolphin, R. Patel and J. B. Clark (1998). "Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system." J Neurochem **70**(4): 1366-1375.
- Dalerba, P., S. J. Dylla, I. K. Park, R. Liu, X. Wang, R. W. Cho, T. Hoey, A. Gurney, E. H. Huang, D. M. Simeone, A. A. Shelton, G. Parmiani, C. Castelli and M. F. Clarke (2007). "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(24): 10158-10163.
- Dela Cruz, F. S. (2013). "Cancer stem cells in pediatric sarcomas." Front Oncol **3**: 168.
- Denysenko, T., L. Gennero, C. Juenemann, I. Morra, P. Masperi, V. Ceroni, A. Pragliola, A. Ponzetto and A. Melcarne (2014). "Heterogeneous phenotype of human glioblastoma: in vitro study." Cell Biochem Funct **32**(2): 164-176.
- Dey, M., I. V. Ulasov and M. S. Lesniak (2010). "Virotherapy against malignant glioma stem cells." Cancer Lett **289**(1): 1-10.
- Dolecek, T. A., J. M. Propp, N. E. Stroup and C. Kruchko (2012). "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009." Neuro Oncol **14 Suppl 5**: v1-49.
- Dreesen, O. and A. H. Brivanlou (2007). "Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells." Stem Cell Rev **3**(1): 7-17.
- Ehtesham, M., A. Sarangi, J. G. Valadez, S. Chanthaphaychith, M. W. Becher, T. W. Abel, R. C. Thompson and M. K. Cooper (2007). "Ligand-dependent activation of the hedgehog pathway in glioma progenitor cells." Oncogene **26**(39): 5752-5761.
- Eller, J. L., S. L. Longo, M. M. Kyle, D. Bassano, D. J. Hicklin and G. W. Canute (2005). "Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab augments radiation effects in glioblastoma multiforme in vitro and in vivo." Neurosurgery **56**(1): 155-162; discussion 162.
- Eyler, C. E., W. C. Foo, K. M. LaFiura, R. E. McLendon, A. B. Hjelmeland and J. N. Rich (2008). "Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition." Stem Cells **26**(12): 3027-3036.
- Fan, X., L. Khaki, T. S. Zhu, M. E. Soules, C. E. Talsma, N. Gul, C. Koh, J. Zhang, Y. M. Li, J. Maciaczyk, G. Nikkhah, F. Dimeco, S. Piccirillo, A. L. Vescovi and C. G. Eberhart

(2010). "NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts." Stem Cells **28**(1): 5-16.

Fan, X., W. Matsui, L. Khaki, D. Stearns, J. Chun, Y. M. Li and C. G. Eberhart (2006). "Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors." Cancer Res **66**(15): 7445-7452.

Fang, D., T. K. Nguyen, K. Leishear, R. Finko, A. N. Kulp, S. Hotz, P. A. Van Belle, X. Xu, D. E. Elder and M. Herlyn (2005). "A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas." Cancer Res **65**(20): 9328-9337.

Fischer, A. and M. Gessler (2007). "Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors." Nucleic Acids Res **35**(14): 4583-4596.

Fisher, J. L., J. A. Schwartzbaum, M. Wrensch and J. L. Wiemels (2007). "Epidemiology of brain tumors." Neurol Clin **25**(4): 867-890, vii.

Foltz, G., J. G. Yoon, H. Lee, L. Ma, Q. Tian, L. Hood and A. Madan (2010). "Epigenetic regulation of wnt pathway antagonists in human glioblastoma multiforme." Genes Cancer **1**(1): 81-90.

Frederick, L., X. Y. Wang, G. Eley and C. D. James (2000). "Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas." Cancer Res **60**(5): 1383-1387.

Frolov, M. V. and N. J. Dyson (2004). "Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression." J Cell Sci **117**(Pt 11): 2173-2181.

Furnari, F. B., T. Fenton, R. M. Bachoo, A. Mukasa, J. M. Stommel, A. Stegh, W. C. Hahn, K. L. Ligon, D. N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R. A. DePinho and W. K. Cavenee (2007). "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." Genes Dev **21**(21): 2683-2710.

Galli, R., E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, S. De Vitis, R. Fiocco, C. Foroni, F. Dimeco and A. Vescovi (2004). "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma." Cancer Res **64**(19): 7011-7021.

Gilbertson, R. J. and J. N. Rich (2007). "Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche." Nat Rev Cancer **7**(10): 733-736.

Griffero, F., A. Daga, D. Marubbi, M. C. Capra, A. Melotti, A. Pattarozzi, M. Gatti, A. Bajetto, C. Porcile, F. Barbieri, R. E. Favoni, M. Lo Casto, G. Zona, R. Spaziante, T. Florio and G. Corte (2009). "Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors." J Biol Chem **284**(11): 7138-7148.

Grommes, C., D. S. Conway, A. Alshekhlee and J. S. Barnholtz-Sloan (2010). "Inverse association of PPAR γ agonists use and high grade glioma development." J Neurooncol **100**(2): 233-239.

- Grommes, C., J. C. Karlo, A. Caprariello, D. Blankenship, A. Dechant and G. E. Landreth (2013). "The PPAR γ agonist pioglitazone crosses the blood-brain barrier and reduces tumor growth in a human xenograft model." Cancer Chemother Pharmacol **71**(4): 929-936.
- Grommes, C., G. E. Landreth, M. Sastre, M. Beck, D. L. Feinstein, A. H. Jacobs, U. Schlegel and M. T. Heneka (2006). "Inhibition of in vivo glioma growth and invasion by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist treatment." Mol Pharmacol **70**(5): 1524-1533.
- Groves, M. D., V. K. Puduvalli, S. M. Chang, C. A. Conrad, M. R. Gilbert, I. W. Tremont-Lukats, T. J. Liu, P. Peterson, D. Schiff, T. F. Cloughesy, P. Y. Wen, H. Greenberg, L. E. Abrey, L. M. DeAngelis, K. R. Hess, K. R. Lamborn, M. D. Prados and W. K. Yung (2007). "A North American brain tumor consortium (NABTC 99-04) phase II trial of temozolomide plus thalidomide for recurrent glioblastoma multiforme." J Neurooncol **81**(3): 271-277.
- Harris, P. K. and R. F. Kletzien (1994). "Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene." Mol Pharmacol **45**(3): 439-445.
- He, B., N. Reguart, L. You, J. Mazieres, Z. Xu, A. Y. Lee, I. Mikami, F. McCormick and D. M. Jablons (2005). "Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations." Oncogene **24**(18): 3054-3058.
- He, F. and Y. E. Sun (2007). "Glial cells more than support cells?" Int J Biochem Cell Biol **39**(4): 661-665.
- He, T. C., T. A. Chan, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1999). "PPAR δ is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs." Cell **99**(3): 335-345.
- Heddleston, J. M., Z. Li, R. E. McLendon, A. B. Hjelmeland and J. N. Rich (2009). "The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype." Cell Cycle **8**(20): 3274-3284.
- Hemmati, H. D., I. Nakano, J. A. Lazareff, M. Masterman-Smith, D. H. Geschwind, M. Bronner-Fraser and H. I. Kornblum (2003). "Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15178-15183.
- Hendrickx, M., X. H. Van and L. Leyns (2009). "Anterior-posterior patterning of neural differentiated embryonic stem cells by canonical Wnts, Fgfs, Bmp4 and their respective antagonists." Dev Growth Differ **51**(8): 687-698.
- Henson, J. W., B. L. Schnitker, K. M. Correa, A. von Deimling, F. Fassbender, H. J. Xu, W. F. Benedict, D. W. Yandell and D. N. Louis (1994). "The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas." Ann Neurol **36**(5): 714-721.
- Hiragun, A., M. Sato and H. Mitsui (1988). "Preadipocyte differentiation in vitro: identification of a highly active adipogenic agent." J Cell Physiol **134**(1): 124-130.

- Ichimura, K., H. Ohgaki, P. Kleihues and V. P. Collins (2004). "Molecular pathogenesis of astrocytic tumours." *J Neurooncol* **70**(2): 137-160.
- Ignatova, T. N., V. G. Kukekov, E. D. Laywell, O. N. Suslov, F. D. Vrionis and D. A. Steindler (2002). "Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro." *Glia* **39**(3): 193-206.
- Inskip, P. D., R. E. Tarone, E. E. Hatch, T. C. Wilcosky, W. R. Shapiro, R. G. Selker, H. A. Fine, P. M. Black, J. S. Loeffler and M. S. Linet (2001). "Cellular-telephone use and brain tumors." *N Engl J Med* **344**(2): 79-86.
- Jandial, R., H. U, M. L. Levy and E. Y. Snyder (2008). "Brain tumor stem cells and the tumor microenvironmen." *Neurosurg Focus* **24**(3-4): E27.
- Jansson, E. A., A. Are, G. Greicius, I. C. Kuo, D. Kelly, V. Arulampalam and S. Pettersson (2005). "The Wnt/beta-catenin signaling pathway targets PPARgamma activity in colon cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(5): 1460-1465.
- Jeon, H. M., X. Jin, J. S. Lee, S. Y. Oh, Y. W. Sohn, H. J. Park, K. M. Joo, W. Y. Park, D. H. Nam, R. A. DePinho, L. Chin and H. Kim (2008). "Inhibitor of differentiation 4 drives brain tumor-initiating cell genesis through cyclin E and notch signaling." *Genes Dev* **22**(15): 2028-2033.
- Kanakasabai, S., E. Pestereva, W. Chearwae, S. K. Gupta, S. Ansari and J. J. Bright (2012). "PPAR γ agonists promote oligodendrocyte differentiation of neural stem cells by modulating stemness and differentiation genes." *PLoS One* **7**(11): e50500.
- Kanamori, M., T. Kawaguchi, J. M. Nigro, B. G. Feuerstein, M. S. Berger, L. Miele and R. O. Pieper (2007). "Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme." *J Neurosurg* **106**(3): 417-427.
- Kanzawa, T., I. M. Germano, T. Komata, H. Ito, Y. Kondo and S. Kondo (2004). "Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells." *Cell Death Differ* **11**(4): 448-457.
- Kaur, N., S. Chettiar, S. Rathod, P. Rath, D. Muzumdar, M. L. Shaikh and A. Shiras (2013). "Wnt3a mediated activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma." *Mol Cell Neurosci* **54**: 44-57.
- Khoo, N. K., S. Hebbar, W. Zhao, S. A. Moore, F. E. Domann and M. E. Robbins (2013). "Differential activation of catalase expression and activity by PPAR agonists: implications for astrocyte protection in anti-glioma therapy." *Redox Biol* **1**(1): 70-79.
- Kinzler, K. W., S. H. Bigner, D. D. Bigner, J. M. Trent, M. L. Law, S. J. O'Brien, A. J. Wong and B. Vogelstein (1987). "Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma." *Science* **236**(4797): 70-73.
- Kletzien, R. F., L. A. Foellmi, P. K. Harris, B. M. Wyse and S. D. Clarke (1992). "Adipocyte fatty acid-binding protein: regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulin-sensitizing agent." *Mol Pharmacol* **42**(4): 558-562.

- Kliwer, S. A., J. M. Lenhard, T. M. Willson, I. Patel, D. C. Morris and J. M. Lehmann (1995). "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation." *Cell* **83**(5): 813-819.
- Knobbe, C. B. and G. Reifenberger (2003). "Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidyl-inositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas." *Brain Pathol* **13**(4): 507-518.
- Koyama, M., Y. Izutani, A. E. Goda, T. A. Matsui, M. Horinaka, M. Tomosugi, J. Fujiwara, Y. Nakamura, M. Wakada, S. Yogosawa, Y. Sowa and T. Sakai (2010). "Histone deacetylase inhibitors and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 synergistically induce apoptosis." *Clin Cancer Res* **16**(8): 2320-2332.
- Kroll, T. G., P. Sarraf, L. Pecciarini, C. J. Chen, E. Mueller, B. M. Spiegelman and J. A. Fletcher (2000). "PAX8-PPARGgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]." *Science* **289**(5483): 1357-1360.
- Kubota, T., K. Koshizuka, E. A. Williamson, H. Asou, J. W. Said, S. Holden, I. Miyoshi and H. P. Koeffler (1998). "Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo." *Cancer Res* **58**(15): 3344-3352.
- Lahkola, A., A. Auvinen, J. Raitanen, M. J. Schoemaker, H. C. Christensen, M. Feychting, C. Johansen, L. Klaeboe, S. Lönn, A. J. Swerdlow, T. Tynes and T. Salminen (2007). "Mobile phone use and risk of glioma in 5 North European countries." *Int J Cancer* **120**(8): 1769-1775.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri and J. E. Dick (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature* **367**(6464): 645-648.
- Lathia, J. D., M. P. Mattson and A. Cheng (2008). "Notch: from neural development to neurological disorders." *J Neurochem* **107**(6): 1471-1481.
- Lee, J., S. Kotliarova, Y. Kotliarov, A. Li, Q. Su, N. M. Donin, S. Pastorino, B. W. Purow, N. Christopher, W. Zhang, J. K. Park and H. A. Fine (2006). "Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines." *Cancer Cell* **9**(5): 391-403.
- Leesnitzer, L. M., D. J. Parks, R. K. Bledsoe, J. E. Cobb, J. L. Collins, T. G. Consler, R. G. Davis, E. A. Hull-Ryde, J. M. Lenhard, L. Patel, K. D. Plunket, J. L. Shenk, J. B. Stimmel, C. Therapontos, T. M. Willson and S. G. Blanchard (2002). "Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662." *Biochemistry* **41**(21): 6640-6650.
- Lefranc, F., J. Brotchi and R. Kiss (2005). "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* **23**(10): 2411-2422.

- Lefranc, F., V. Facchini and R. Kiss (2007). "Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas." Oncologist **12**(12): 1395-1403.
- Lehman, J. M., E. Dickerson, T. Friedrich and J. Laffin (1995). "Increase in total protein following infection of CV-1 cells with SV40 virus as assayed by flow cytometry." In Vitro Cell Dev Biol Anim **31**(10): 806-810.
- Li, H., A. L. Sorenson, J. Poczobutt, J. Amin, T. Joyal, T. Sullivan, J. T. Crossno, M. C. Weiser-Evans and R. A. Nemenoff (2011). "Activation of PPAR γ in myeloid cells promotes lung cancer progression and metastasis." PLoS One **6**(12): e28133.
- Li, T., G. X. Fan, W. Wang and Y. K. Yuan (2007). "Resveratrol induces apoptosis, influences IL-6 and exerts immunomodulatory effect on mouse lymphocytic leukemia both in vitro and in vivo." Int Immunopharmacol **7**(9): 1221-1231.
- Li, Z., S. Bao, Q. Wu, H. Wang, C. Eyler, S. Sathornsumetee, Q. Shi, Y. Cao, J. Lathia, R. E. McLendon, A. B. Hjelmeland and J. N. Rich (2009). "Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells." Cancer Cell **15**(6): 501-513.
- Linares, L. K., A. Hengstermann, A. Ciechanover, S. Müller and M. Scheffner (2003). "HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12009-12014.
- Linos, E., T. Raine, A. Alonso and D. Michaud (2007). "Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis." J Natl Cancer Inst **99**(20): 1544-1550.
- Liu, C. and X. He (2010). "Destruction of a destructor: a new avenue for cancer therapeutics targeting the Wnt pathway." J Mol Cell Biol **2**(2): 70-73.
- Liu, C., Y. Tu, X. Sun, J. Jiang, X. Jin, X. Bo, Z. Li, A. Bian, X. Wang, D. Liu, Z. Wang and L. Ding (2011). "Wnt/beta-Catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations." Clin Exp Med **11**(2): 105-112.
- Liu, D. C., C. B. Zang, H. Y. Liu, K. Possinger, S. G. Fan and E. Elstner (2004). "A novel PPAR alpha/gamma dual agonist inhibits cell growth and induces apoptosis in human glioblastoma T98G cells." Acta Pharmacol Sin **25**(10): 1312-1319.
- Liu, G., X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black and J. S. Yu (2006). "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma." Mol Cancer **5**: 67.
- Lobo, N. A., Y. Shimono, D. Qian and M. F. Clarke (2007). "The biology of cancer stem cells." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 675-699.
- Long, G. G., V. L. Reynolds, L. W. Dochterman and T. E. Ryan (2009). "Neoplastic and non-neoplastic changes in F-344 rats treated with Naveglitazar, a gamma-dominant PPAR alpha/gamma agonist." Toxicol Pathol **37**(6): 741-753.
- Louis, D. N. (1994). "The p53 gene and protein in human brain tumors." J Neuropathol Exp Neurol **53**(1): 11-21.

- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvett, B. W. Scheithauer and P. Kleihues (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, A. Kimchi and G. Kroemer (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 741-752.
- Malkin, D., F. P. Li, L. C. Strong, J. F. Fraumeni, C. E. Nelson, D. H. Kim, J. Kassel, M. A. Gryka, F. Z. Bischoff and M. A. Tainsky (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." Science **250**(4985): 1233-1238.
- Mansure, J. J., R. Nassim and W. Kassouf (2009). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer: a promising therapeutic target." Cancer Biol Ther **8**(7): 6-15.
- Martí, E. and P. Bovolenta (2002). "Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs." Trends Neurosci **25**(2): 89-96.
- McCord, A. M., M. Jamal, U. T. Shankavaram, U. T. Shankavarum, F. F. Lang, K. Camphausen and P. J. Tofilon (2009). "Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro." Mol Cancer Res **7**(4): 489-497.
- Mellinghoff, I. K., M. Y. Wang, I. Vivanco, D. A. Haas-Kogan, S. Zhu, E. Q. Dia, K. V. Lu, K. Yoshimoto, J. H. Huang, D. J. Chute, B. L. Riggs, S. Horvath, L. M. Liau, W. K. Cavenee, P. N. Rao, R. Beroukhi, T. C. Peck, J. C. Lee, W. R. Sellers, D. Stokoe, M. Prados, T. F. Cloughesy, C. L. Sawyers and P. S. Mischel (2005). "Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors." N Engl J Med **353**(19): 2012-2024.
- Miller, C. R. and A. Perry (2007). "Glioblastoma." Arch Pathol Lab Med **131**(3): 397-406.
- Mo, C., W. Chearwae and J. J. Bright (2010). "PPARgamma regulates LIF-induced growth and self-renewal of mouse ES cells through Tyk2-Stat3 pathway." Cell Signal **22**(3): 495-500.
- Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem cells and their niches." Science **311**(5769): 1880-1885.
- Moscatello, D. K., M. Holgado-Madruga, D. R. Emlet, R. B. Montgomery and A. J. Wong (1998). "Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **273**(1): 200-206.
- Mueller, E., P. Sarraf, P. Tontonoz, R. M. Evans, K. J. Martin, M. Zhang, C. Fletcher, S. Singer and B. M. Spiegelman (1998). "Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma." Mol Cell **1**(3): 465-470.

Mueller, E., M. Smith, P. Sarraf, T. Kroll, A. Aiyer, D. S. Kaufman, W. Oh, G. Demetri, W. D. Figg, X. P. Zhou, C. Eng, B. M. Spiegelman and P. W. Kantoff (2000). "Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10990-10995.

Muller, D. N., J. Theuer, E. Shagdarsuren, E. Kaergel, H. Honeck, J. K. Park, M. Markovic, E. Barbosa-Sicard, R. Dechend, M. Wellner, T. Kirsch, A. Fiebeler, M. Rothe, H. Haller, F. C. Luft and W. H. Schunck (2004). "A peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator induces renal CYP2C23 activity and protects from angiotensin II-induced renal injury." Am J Pathol **164**(2): 521-532.

Nakada, M., S. Nakada, T. Demuth, N. L. Tran, D. B. Hoelzinger and M. E. Berens (2007). "Molecular targets of glioma invasion." Cell Mol Life Sci **64**(4): 458-478.

Narita, Y., M. Nagane, K. Mishima, H. J. Huang, F. B. Furnari and W. K. Cavenee (2002). "Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas." Cancer Res **62**(22): 6764-6769.

Network, C. G. A. R. (2008). "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." Nature **455**(7216): 1061-1068.

Nishikawa, R., X. D. Ji, R. C. Harmon, C. S. Lazar, G. N. Gill, W. K. Cavenee and H. J. Huang (1994). "A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7727-7731.

O'Brien, C. A., A. Pollett, S. Gallinger and J. E. Dick (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-110.

Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P. L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schöler, N. M. Probst-Hensch, P. C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M. G. Yasargil, U. M. Lütolf and P. Kleihues (2004). "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study." Cancer Res **64**(19): 6892-6899.

Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Epidemiology and etiology of gliomas." Acta Neuropathol **109**(1): 93-108.

Ohgaki, H. and P. Kleihues (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma." Am J Pathol **170**(5): 1445-1453.

Palakurthi, S. S., H. Aktas, L. M. Grubisich, R. M. Mortensen and J. A. Halperin (2001). "Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation." Cancer Res **61**(16): 6213-6218.

Palmer, T. D., A. R. Willhoite and F. H. Gage (2000). "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis." J Comp Neurol **425**(4): 479-494.

- Panigrahy, D., S. Singer, L. Q. Shen, C. E. Butterfield, D. A. Freedman, E. J. Chen, M. A. Moses, S. Kilroy, S. Duensing, C. Fletcher, J. A. Fletcher, L. Hlatky, P. Hahnfeldt, J. Folkman and A. Kaipainen (2002). "PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis." *J Clin Invest* **110**(7): 923-932.
- Papi, A., L. Tatenhorst, D. Terwel, M. Hermes, M. P. Kummer, M. Orlandi and M. T. Heneka (2009). "PPARgamma and RXRgamma ligands act synergistically as potent antineoplastic agents in vitro and in vivo glioma models." *J Neurochem* **109**(6): 1779-1790.
- Pardal, R., M. F. Clarke and S. J. Morrison (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." *Nat Rev Cancer* **3**(12): 895-902.
- Pestereva, E., S. Kanakasabai and J. J. Bright (2012). "PPAR γ agonists regulate the expression of stemness and differentiation genes in brain tumour stem cells." *Br J Cancer* **106**(10): 1702-1712.
- Preusser, M., C. Haberler and J. A. Hainfellner (2006). "Malignant glioma: neuropathology and neurobiology." *Wien Med Wochenschr* **156**(11-12): 332-337.
- Rao, J. S., P. A. Steck, S. Mohanam, W. G. Stetler-Stevenson, L. A. Liotta and R. Sawaya (1993). "Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors." *Cancer Res* **53**(10 Suppl): 2208-2211.
- Ray, D. M., F. Akbiyik and R. P. Phipps (2006). "The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and ciglitazone induce human B lymphocyte and B cell lymphoma apoptosis by PPARgamma-independent mechanisms." *J Immunol* **177**(8): 5068-5076.
- Reifenberger, G. and V. P. Collins (2004). "Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas." *J Mol Med (Berl)* **82**(10): 656-670.
- Reifenberger, G., J. Reifenberger, K. Ichimura, P. S. Meltzer and V. P. Collins (1994). "Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2." *Cancer Res* **54**(16): 4299-4303.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* **414**(6859): 105-111.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Piloizzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle and R. De Maria (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* **445**(7123): 111-115.
- Riemenschneider, M. J., R. Büschges, M. Wolter, J. Reifenberger, J. Boström, J. A. Kraus, U. Schlegel and G. Reifenberger (1999). "Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification." *Cancer Res* **59**(24): 6091-6096.

Riva, G., S. Baronchelli, L. Paoletta, V. Butta, I. Biunno, M. Lavitrano, L. Dalprà and A. Bentivegna (2014). "In vitro anticancer drug test: A new method emerges from the model of glioma stem cells." Toxicology Reports **1**(0): 188-199.

Romer, J. T., H. Kimura, S. Magdaleno, K. Sasai, C. Fuller, H. Baines, M. Connelly, C. F. Stewart, S. Gould, L. L. Rubin and T. Curran (2004). "Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice." Cancer Cell **6**(3): 229-240.

Roos, W. P., L. F. Batista, S. C. Naumann, W. Wick, M. Weller, C. F. Menck and B. Kaina (2007). "Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine." Oncogene **26**(2): 186-197.

Rosen, J. M. and C. T. Jordan (2009). "The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm." Science **324**(5935): 1670-1673.

Saez, E., P. Tontonoz, M. C. Nelson, J. G. Alvarez, U. T. Ming, S. M. Baird, V. A. Thomazy and R. M. Evans (1998). "Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation." Nat Med **4**(9): 1058-1061.

Sanai, N., A. Alvarez-Buylla and M. S. Berger (2005). "Neural stem cells and the origin of gliomas." N Engl J Med **353**(8): 811-822.

Sareddy, G. R., M. Panigrahi, S. Challa, A. Mahadevan and P. P. Babu (2009). "Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas." Neurochem Int **55**(5): 307-317.

Sarraf, P., E. Mueller, W. M. Smith, H. M. Wright, J. B. Kum, L. A. Aaltonen, A. de la Chapelle, B. M. Spiegelman and C. Eng (1999). "Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer." Mol Cell **3**(6): 799-804.

Sato, H., S. Ishihara, K. Kawashima, N. Moriyama, H. Suetsugu, H. Kazumori, T. Okuyama, M. A. Rumi, R. Fukuda, N. Nagasue and Y. Kinoshita (2000). "Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma in gastric cancer and inhibitory effects of PPARgamma agonists." Br J Cancer **83**(10): 1394-1400.

Schmidt, E. E., K. Ichimura, G. Reifenberger and V. P. Collins (1994). "CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas." Cancer Res **54**(24): 6321-6324.

Schmitz, M., A. Temme, V. Senner, R. Ebner, S. Schwind, S. Stevanovic, R. Wehner, G. Schackert, H. K. Schackert, M. Fussel, M. Bachmann, E. P. Rieber and B. Weigle (2007). "Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy." Br J Cancer **96**(8): 1293-1301.

Shahi, M. H., A. Lorente and J. S. Castresana (2008). "Hedgehog signalling in medulloblastoma, glioblastoma and neuroblastoma." Oncol Rep **19**(3): 681-688.

Sherr, C. J. and F. McCormick (2002). "The RB and p53 pathways in cancer." Cancer Cell **2**(2): 103-112.

- Sherry, M. M., A. Reeves, J. K. Wu and B. H. Cochran (2009). "STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells." Stem Cells **27**(10): 2383-2392.
- Shih, A. H. and E. C. Holland (2006). "Notch signaling enhances nestin expression in gliomas." Neoplasia **8**(12): 1072-1082.
- Shvarts, A., W. T. Steegenga, N. Riteco, T. van Laar, P. Dekker, M. Bazuine, R. C. van Ham, W. van der Houven van Oordt, G. Hateboer, A. J. van der Eb and A. G. Jochemsen (1996). "MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2." EMBO J **15**(19): 5349-5357.
- Simula, M. P., R. Cannizzaro, V. Canzonieri, A. Pavan, S. Maiero, G. Toffoli and V. De Re (2010). "PPAR signaling pathway and cancer-related proteins are involved in celiac disease-associated tissue damage." Mol Med **16**(5-6): 199-209.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire and P. B. Dirks (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-5828.
- Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano and P. B. Dirks (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.
- Soeda, A., A. Inagaki, N. Oka, Y. Ikegame, H. Aoki, S. Yoshimura, S. Nakashima, T. Kunisada and T. Iwama (2008). "Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells." J Biol Chem **283**(16): 10958-10966.
- Soeda, A., M. Park, D. Lee, A. Mintz, A. Androutsellis-Theotokis, R. D. McKay, J. Engh, T. Iwama, T. Kunisada, A. B. Kassam, I. F. Pollack and D. M. Park (2009). "Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha." Oncogene **28**(45): 3949-3959.
- Soffietti, R., R. Rudà and E. Trevisan (2007). "New chemotherapy options for the treatment of malignant gliomas." Anticancer Drugs **18**(6): 621-632.
- Spagnolo, A., E. N. Grant, R. Glick, T. Lichtor and D. L. Feinstein (2007). "Differential effects of PPARgamma agonists on the metabolic properties of gliomas and astrocytes." Neurosci Lett **417**(1): 72-77.
- Sparks, R. L., E. E. Strauss, A. I. Zygmunt and T. E. Phelan (1991). "Antidiabetic AD4743 enhances adipocyte differentiation of 3T3 T mesenchymal stem cells." J Cell Physiol **146**(1): 101-109.
- Srivastava, S., Z. Q. Zou, K. Pirollo, W. Blattner and E. H. Chang (1990). "Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome." Nature **348**(6303): 747-749.
- Stechishin, O. D., H. A. Luchman, Y. Ruan, M. D. Blough, S. A. Nguyen, J. J. Kelly, J. G. Cairncross and S. Weiss (2013). "On-target JAK2/STAT3 inhibition slows disease

progression in orthotopic xenografts of human glioblastoma brain tumor stem cells." Neuro Oncol **15**(2): 198-207.

Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff, E. O. f. R. a. T. o. C. B. T. a. R. Groups and N. C. I. o. C. C. T. Group (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-996.

Sugawa, N., A. J. Ekstrand, C. D. James and V. P. Collins (1990). "Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8602-8606.

Sunami, E., N. H. Tsuno, J. Kitayama, S. Saito, T. Osada, H. Yamaguchi, S. Tomozawa, T. Tsuruo, Y. Shibata and H. Nagawa (2002). "Decreased synthesis of matrix metalloproteinase-7 and adhesion to the extracellular matrix proteins of human colon cancer cells treated with troglitazone." Surg Today **32**(4): 343-350.

Suslov, O. N., V. G. Kukekov, T. N. Ignatova and D. A. Steindler (2002). "Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14506-14511.

Sérandour, A. A., S. Avner, F. Oger, M. Bizot, F. Percevault, C. Lucchetti-Miganeh, G. Palierne, C. Gheeraert, F. Barloy-Hubler, C. L. Péron, T. Madigou, E. Durand, P. Froguel, B. Staels, P. Lefebvre, R. Métivier, J. Eeckhoutte and G. Salbert (2012). "Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers." Nucleic Acids Res **40**(17): 8255-8265.

Tanaka, T., H. Kohno, S. Yoshitani, S. Takashima, A. Okumura, A. Murakami and M. Hosokawa (2001). "Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats." Cancer Res **61**(6): 2424-2428.

Thieringer, R., J. E. Fenyk-Melody, C. B. Le Grand, B. A. Shelton, P. A. Detmers, E. P. Somers, L. Carbin, D. E. Moller, S. D. Wright and J. Berger (2000). "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo." J Immunol **164**(2): 1046-1054.

Tontonoz, P., E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari and B. M. Spiegelman (1994). "mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer." Genes Dev **8**(10): 1224-1234.

Tontonoz, P., S. Singer, B. M. Forman, P. Sarraf, J. A. Fletcher, C. D. Fletcher, R. P. Brun, E. Mueller, S. Altiock, H. Oppenheim, R. M. Evans and B. M. Spiegelman (1997). "Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(1): 237-241.

- Tseng, C. H. and F. H. Tseng (2012). "Peroxisome proliferator-activated receptor agonists and bladder cancer: lessons from animal studies." J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoicol Rev **30**(4): 368-402.
- Tsubouchi, Y., H. Sano, Y. Kawahito, S. Mukai, R. Yamada, M. Kohno, K. Inoue, T. Hla and M. Kondo (2000). "Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **270**(2): 400-405.
- Ueki, K., Y. Ono, J. W. Henson, J. T. Efird, A. von Deimling and D. N. Louis (1996). "CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated." Cancer Res **56**(1): 150-153.
- Vescovi, A. L., R. Galli and B. A. Reynolds (2006). "Brain tumour stem cells." Nat Rev Cancer **6**(6): 425-436.
- Villalva, C., S. Martin-Lannerée, U. Cortes, F. Dkhissi, M. Wager, A. Le Corf, J. M. Tourani, I. Dusanter-Fourt, A. G. Turhan and L. Karayan-Tapon (2011). "STAT3 is essential for the maintenance of neurosphere-initiating tumor cells in patients with glioblastomas: a potential for targeted therapy?" Int J Cancer **128**(4): 826-838.
- Vousden, K. H. and X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
- Vredenburgh, J. J., A. Desjardins, J. E. Herndon, J. M. Dowell, D. A. Reardon, J. A. Quinn, J. N. Rich, S. Sathornsumetee, S. Gururangan, M. Wagner, D. D. Bigner, A. H. Friedman and H. S. Friedman (2007). "Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma." Clin Cancer Res **13**(4): 1253-1259.
- Vredenburgh, J. J., A. Desjardins, J. E. Herndon, J. Marcello, D. A. Reardon, J. A. Quinn, J. N. Rich, S. Sathornsumetee, S. Gururangan, J. Sampson, M. Wagner, L. Bailey, D. D. Bigner, A. H. Friedman and H. S. Friedman (2007). "Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme." J Clin Oncol **25**(30): 4722-4729.
- Wan, Z., W. Shi, B. Shao, J. Shi, A. Shen, Y. Ma, J. Chen and Q. Lan (2011). "Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist pioglitazone inhibits β -catenin-mediated glioma cell growth and invasion." Mol Cell Biochem **349**(1-2): 1-10.
- Wang, J., T. P. Wakeman, J. D. Lathia, A. B. Hjelmeland, X. F. Wang, R. R. White, J. N. Rich and B. A. Sullenger (2010). "Notch promotes radioresistance of glioma stem cells." Stem Cells **28**(1): 17-28.
- Wang, M., T. Wang, S. Liu, D. Yoshida and A. Teramoto (2003). "The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades." Brain Tumor Pathol **20**(2): 65-72.
- Wang, R. H., K. Sengupta, C. Li, H. S. Kim, L. Cao, C. Xiao, S. Kim, X. Xu, Y. Zheng, B. Chilton, R. Jia, Z. M. Zheng, E. Appella, X. W. Wang, T. Ried and C. X. Deng (2008).

"Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice." Cancer Cell **14**(4): 312-323.

Wechsler-Reya, R. J. and M. P. Scott (1999). "Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog." Neuron **22**(1): 103-114.

Wei, J., J. Barr, L. Y. Kong, Y. Wang, A. Wu, A. K. Sharma, J. Gumin, V. Henry, H. Colman, W. Priebe, R. Sawaya, F. F. Lang and A. B. Heimberger (2010). "Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway." Mol Cancer Ther **9**(1): 67-78.

Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-330.

Wen, P. Y. and S. Kesari (2008). "Malignant gliomas in adults." N Engl J Med **359**(5): 492-507.

Wen, P. Y., S. Kesari and J. Drappatz (2006). "Malignant gliomas: strategies to increase the effectiveness of targeted molecular treatment." Expert Rev Anticancer Ther **6**(5): 733-754.

Willson, T. M., J. M. Lehmann and S. A. Kliewer (1996). "Discovery of ligands for the nuclear peroxisome proliferator-activated receptors." Ann N Y Acad Sci **804**: 276-283.

Wiltshire, R. N., B. K. Rasheed, H. S. Friedman, A. H. Friedman and S. H. Bigner (2000). "Comparative genetic patterns of glioblastoma multiforme: potential diagnostic tool for tumor classification." Neuro Oncol **2**(3): 164-173.

Wrensch, M., J. K. Wiencke, J. Wiemels, R. Miike, J. Patoka, M. Moghadassi, A. McMillan, K. T. Kelsey, K. Aldape, K. R. Lamborn, A. T. Parsa, J. D. Sison and M. D. Prados (2006). "Serum IgE, tumor epidermal growth factor receptor expression, and inherited polymorphisms associated with glioma survival." Cancer Res **66**(8): 4531-4541.

Wurmser, A. E., T. D. Palmer and F. H. Gage (2004). "Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche." Science **304**(5675): 1253-1255.

Xin, X., S. Yang, J. Kowalski and M. E. Gerritsen (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo." J Biol Chem **274**(13): 9116-9121.

Xu, Q., X. Yuan, G. Liu, K. L. Black and J. S. Yu (2008). "Hedgehog signaling regulates brain tumor-initiating cell proliferation and portends shorter survival for patients with PTEN-coexpressing glioblastomas." Stem Cells **26**(12): 3018-3026.

Ying, Y. and Q. Tao (2009). "Epigenetic disruption of the WNT/beta-catenin signaling pathway in human cancers." Epigenetics **4**(5): 307-312.

Zander, T., J. A. Kraus, C. Grommes, U. Schlegel, D. Feinstein, T. Klockgether, G. Landreth, J. Koenigsknecht and M. T. Heneka (2002). "Induction of apoptosis in human and rat glioma by agonists of the nuclear receptor PPARgamma." *J Neurochem* **81**(5): 1052-1060.

Zang, C., M. Wächter, H. Liu, M. G. Posch, M. H. Fenner, C. Stadelmann, A. von Deimling, K. Possinger, K. L. Black, H. P. Koeffler and E. Elstner (2003). "Ligands for PPARgamma and RAR cause induction of growth inhibition and apoptosis in human glioblastomas." *J Neurooncol* **65**(2): 107-118.

Zheng, H., H. Ying, R. Wiedemeyer, H. Yan, S. N. Quayle, E. V. Ivanova, J. H. Paik, H. Zhang, Y. Xiao, S. R. Perry, J. Hu, A. Vinjamoori, B. Gan, E. Sahin, M. G. Chheda, C. Brennan, Y. A. Wang, W. C. Hahn, L. Chin and R. A. DePinho (2010). "PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas." *Cancer Cell* **17**(5): 497-509.

Zheng, X., G. Shen, X. Yang and W. Liu (2007). "Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses." *Cancer Res* **67**(8): 3691-3697.

Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, B. Spohn, M. H. Lee and M. C. Hung (2001). "Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells." *Nat Cell Biol* **3**(3): 245-252.