

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA



Dottorato di ricerca in Medicina Sperimentale
(XXXI Ciclo)

*Curriculum: Patologia Molecolare e Cellulare di
Malattie correlate all'invecchiamento*

**Modulazione di CD44/xCT come possibile
strategia per contrastare la resistenza
all'Etoposide di cellule staminali del cancro**

Candidato:

Dott. Andrea Speciale

Tutor:

Prof.ssa Cinzia M. Domenicotti

Coordinatore del Corso di Dottorato

Prof. Giambattista Bonanno

INDICE

	Pag.
INTRODUZIONE	1
1. FARMACI ANTINEOPLASTICI	1
1.2 Chemioterapia	1
1.3 Etoposide	2
2. LA CHEMIORESISTENZA	6
3. LE CELLULE STAMINALI DEL CANCRO	13
3.1 Cellule staminali e Cellule Staminali del Cancro	15
3.2 Identificazione delle CSC nei tumori	17
3.3 CSC e resistenza alle terapie	18
3.4 Metabolismo delle CSC	19
3.5 Stato ossidativo delle CSC	24
3.5.1 GSH e CSC: ruolo di xCT e CD44	33
3.6 Inibizione della PKC α nella terapia antitumorale	38
3.7 Sulfasalazina: un inibitore di xCT	40
4. L'IMPORTANTE RUOLO DELLA MODULAZIONE DELL'EQUILIBRIO REDOX NELLA TERAPIA ANTITUMORALE	43
5. SCOPO DELLA RICERCA	46
6. MATERIALI E METODI	47
6.1 Sostanze chimiche	47
6.2 Allestimento e mantenimento delle CSC	47
6.3 Trattamenti	49
6.4 Immunofluorescenza e analisi citofluorimetrica	49
6.5 Analisi della propagazione delle CSC	50
6.6 Analisi mediante HPLC dei livelli intracellulari di cisteina totale, glutatione ridotto (GSH) e glutatione ossidato (GSSG)	50
6.7 Analisi dei livelli proteici con metodo Lowry	51
6.8 Analisi della sintesi di ATP	52
6.9 Analisi del consumo dell'ossigeno (OCR)	52
6.10 Analisi del consumo di glucosio	52
6.11 Analisi del rilascio di acido lattico	53
6.12 Analisi della produzione di malondialdeide (MDA)	53
6.13 Estrazione delle proteine totali	53
6.14 Dosaggio delle proteine totali con metodo BCA	54
6.15 Analisi dei livelli di proteina con <i>immunoblotting</i> .	55
6.16 Analisi statistica dei risultati	55
7. RISULTATI	57
7.1 Le neurosfere selezionate dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER esprimono i marcatori di staminalità Oct3/4 e CD44v9	57
7.2 Le CSC delle HTLA-230 e HTLA-ER esprimono xCT e CD44v9	59
7.3 L'Etoposide impedisce la formazione di neurosfere derivate dalle cellule HTLA-230 dopo 3 settimane di	

trattamento	61
7.4 I co-trattamenti di Etoposide con SSZ o con l'inibitore di PKC α sono più efficaci dell'Etoposide da sola nell'impedire la formazione delle neurosfere derivanti dalle cellule HTLA-ER	62
7.5 Il trattamento con Etoposide induce una marcata deplezione di GSH nelle CSC derivate dalle cellule HTLA-230 dopo 2 settimane e nelle CSC derivate dalle cellule HTLA-ER dopo 5 settimane	64
7.6 Il trattamento con Etoposide delle CSC originate dalle HTLA-ER dopo 2 e 5 settimane induce un incremento dei livelli di cisteina	66
7.7 La sintesi di ATP nelle CSC derivate dalle HTLA-230 è diminuita già dopo 2 settimane di trattamento con Etoposide, mentre tale effetto si osserva nelle CSC delle HTLA-ER dopo 5 settimane ed in presenza di C 2-4 o SSZ	67
7.8 Il consumo di O ₂ nelle CSC delle HTLA-230 è diminuito già dopo 2 settimane di trattamento con Etoposide da sola o in associazione con C 2-4 o SSZ mentre nelle CSC delle HTLA-ER gli stessi trattamenti singoli e combinati protratti per 2 o 5 settimane non alterano il consumo di O ₂ dei controlli	69
7.9 Il trattamento per 2 settimane con Etoposide da sola o in associazione con C 2-4 o SSZ induce un aumento del consumo di glucosio e della produzione di acido lattico nelle CSC delle HTLA-230. Gli stessi trattamenti per 2 e 5 settimane portano ad aumento del consumo di glucosio nelle CSC delle HTLA-ER mentre solo l'associazione di Etoposide con C 2-4 o SSZ è in grado di aumentare il rilascio di acido lattico da parte delle stesse	72
7.10 Il trattamento con Etoposide per 2 settimane induce perossidazione lipidica nelle CSC delle HTLA-230 e tale evento è indotto nelle CSC (HTLA-ER) in presenza del trattamento combinato di Etoposide e SSZ o di Etoposide e C 2-4	75
7.11 Il trattamento per 5 settimane con Etoposide induce nelle CSC delle HTLA-ER una marcata riduzione dell'espressione della glutatione perossidasi-4	76
8. DISCUSSIONE	78
9. CONCLUSIONI	84
10. BIBLIOGRAFIA	85
PUBBLICAZIONI	109

INTRODUZIONE

In questi decenni sono state sperimentate molte terapie per sconfiggere i tumori, dalla terapia farmacologica, alla rimozione chirurgica, alla radioterapia. L'utilizzo della chemioterapia per la cura del cancro risale all'inizio del ventesimo secolo ma nel corso degli anni si è assistito allo sviluppo di farmaci innovativi con la finalità di migliorare la sopravvivenza dei pazienti (DeVita V.T., et al. 2008).

Tuttavia, il trattamento dei tumori continua a presentare molte problematiche che sono strettamente correlate al fenomeno della chemioresistenza che si instaura in seguito alla terapia protratta ed è riconosciuta come la prima causa di fallimento terapeutico.

La resistenza ai farmaci può essere una caratteristica intrinseca (naturale) o estrinseca (acquisita) ed in entrambi i casi le cellule tumorali tendono a sviluppare multiresistenza a vari agenti chemioterapici strutturalmente e funzionalmente differenti.

Recentemente, le cellule staminali del cancro (CSC) hanno acquisito un intenso interesse come cellule responsabili dello sviluppo di recidive in seguito alla chemioterapia (Abdullah L.N., et al. 2013). Infatti, esse hanno un basso tasso di proliferazione e sono meno influenzate dalle terapie che agiscono preferenzialmente su cellule con un elevato indice proliferativo. Inoltre, le CSC hanno una maggiore capacità di riparare il danno al DNA indotto dai trattamenti (Jihe Z., 2016; Diaz A., et al. 2011).

Pertanto, l'eliminazione di questa sottopopolazione potrebbe consentire un maggior controllo dello sviluppo del tumore o la cura stessa del cancro (Reya T., et al. 2001).

1. FARMACI ANTINEOPLASTICI

1.1 Chemioterapia

La chemioterapia, che si basa sull'utilizzo di farmaci, rappresenta un approccio convenzionale di trattamento anticancro. Gli agenti chemioterapici utilizzati sono tradizionalmente divisi per la loro origine o meccanismo d'azione ed i gruppi principali includono: a) agenti alchilanti,

come la ciclofosfamide, che agisce alchilando il DNA; b) antimetaboliti, come la 5-fluorouracile, che impedisce la formazione dei normali metaboliti cellulari; c) antibiotici antitumorali, come le tetracicline; d) antimitotici, come gli alcaloidi della vinca, che interferiscono con la mitosi cellulare e, in particolare, sia con la formazione sia con la disgregazione del fuso mitotico, ed e) veleni ed inibitori delle topoisomerasi, come le podofillotossine (etoposide e teniposide), che inibiscono il normale funzionamento di un enzima cellulare, la topoisomerasi di tipo II (Williams D.A., et al. 2005).

La scelta del chemioterapico può variare in base al tipo ed allo stadio del tumore, nonché all'età ed alla salute del paziente. Le modalità di somministrazione sono diverse e comprendono la via orale, l'applicazione transcutanea o addominale, l'iniezione intramuscolo o direttamente nella vena o nell'arteria. A seconda del tipo e della dose di chemioterapico utilizzato, si possono avere numerosi effetti collaterali che possono variare anche in dipendenza della risposta individuale dell'organismo.

La chemioterapia è finalizzata ad uccidere le cellule tumorali a crescita rapida, ma tale meccanismo d'azione può colpire anche le cellule in rapida crescita del corpo (cellule labili, secondo una classificazione del patologo Bizzozero), come: i) le cellule del sangue con conseguente anemia, formazione di ematomi ed aumento del rischio di infezione; ii) i follicoli piliferi, con conseguente perdita temporanea di capelli, e iii) molte altre cellule delle mucose dell'apparato digerente, dell'apparato riproduttivo, dei reni e del sistema nervoso, portando nausea, perdita dell'appetito, stitichezza e diarrea.

1.2 Etoposide

L'Etoposide è un importante agente chemioterapico che viene utilizzato per trattare un ampio spettro di tumori umani. È in uso clinico da più di due decenni e rimane uno dei farmaci antitumorali più prescritti nel mondo. L'Etoposide è una molecola naturale vegetale, uno degli analoghi più importanti delle podofillotossine, estratta dal *Podophillum peltatum* (L.)

una pianta erbacea perenne della famiglia delle Berberidaceae e che rientra nella categoria dei veleni delle topoisomerasi (Takayama T., et al. 2016).

La molecola viene estratta dalla radice e dagli altri organi sotterranei e, per la sua importanza, spesso funge da composto di riferimento nei dosaggi enzimatici. Molti analoghi delle podofillotossine sono stati sintetizzati allo scopo di migliorare l'attività del composto del farmaco progenitore ed il primo agente antitumorale di successo anti-topoisomerasi II che ha mostrato efficacia clinica fu proprio l'Etoposide (Badwin E.L., et al. 2005). Per migliorare la sua idrosolubilità, è stata sviluppata l'Etoposide fosfato (Etophos) per uso intravenoso (Witterland A.H.I., et al. 1996; Greco F.A., et al. 1996). Inoltre è stata approvata anche la teniposide, un analogo dell'Etoposide, utilizzata per trattare la leucemia linfoblastica acuta nei bambini (Grem J.L., et al. 1988) ed altri tumori, come il linfoma di Hodgkin e neoplasie cerebrali. La teniposide è meno idrosolubile e si lega maggiormente alle proteine plasmatiche rispetto all'Etoposide (Clark P.I., et al. 1987; Petros W.P., et al. 1992).

Il *target* citotossico primario dell'Etoposide è la topoisomerasi II (Badwin E.L., et al. 2005). Le DNA topoisomerasi sono responsabili del disavvolgimento del DNA e svolgono un ruolo fondamentale in molti processi biologici che coinvolgono il DNA stesso, giocando ruoli vitali nella replicazione, trascrizione, separazione cromosomica e segregazione (Nitiss J.L., 1998; Wang J.C., 2002; Nitiss J.L., 2009). Esistono due tipi di DNA topoisomerasi, di tipo I e di tipo II. Le topoisomerasi di tipo I rompono un solo filamento di DNA e ne esistono tre sottotipi: IA, IB e IC.

Le topoisomerasi di tipo II, invece, durante la replicazione tagliano entrambi i filamenti di DNA al fine permettere alle cellule di modificare transitoriamente lo stato di superavvolgimento in cui si trova l'acido nucleico (Champoux J.J., 2001; Pommier Y., et al. 2016). La topoisomerasi II esiste come due isoforme altamente omologhe, alfa e beta, che differiscono nella loro produzione durante il ciclo cellulare. L'isoforma alfa sembra essere il bersaglio dell'Etoposide (Gatto B., et al. 2003). Per la loro attività, le topoisomerasi hanno bisogno dello ione Mg^{+} e dell'energia della

molecola di ATP, solitamente per promuovere l'attività catalitica (Champoux J.J., 2001; Corbett K.D., et al. 2004; Berger J.M., 1998). Quando le topoisomerasi di tipo II scindono due filamenti di DNA, formano legami fosfotirosinici tra le due tirosine del sito attivo ed una coppia di 5'-fosfati per garantire il ripristino dell'integrità del DNA (Champoux J.J., 2001; Pommier Y., et al. 2016). Le analisi delle strutture cristalline di un complesso topoisomerasi II-DNA-inibitore offre l'immagine del complesso umano topo-II-DNA-Etoposide e dimostra come l'Etoposide interagisca con il DNA e l'enzima topoisomerasi II (Wu C.C., et al. 2011).

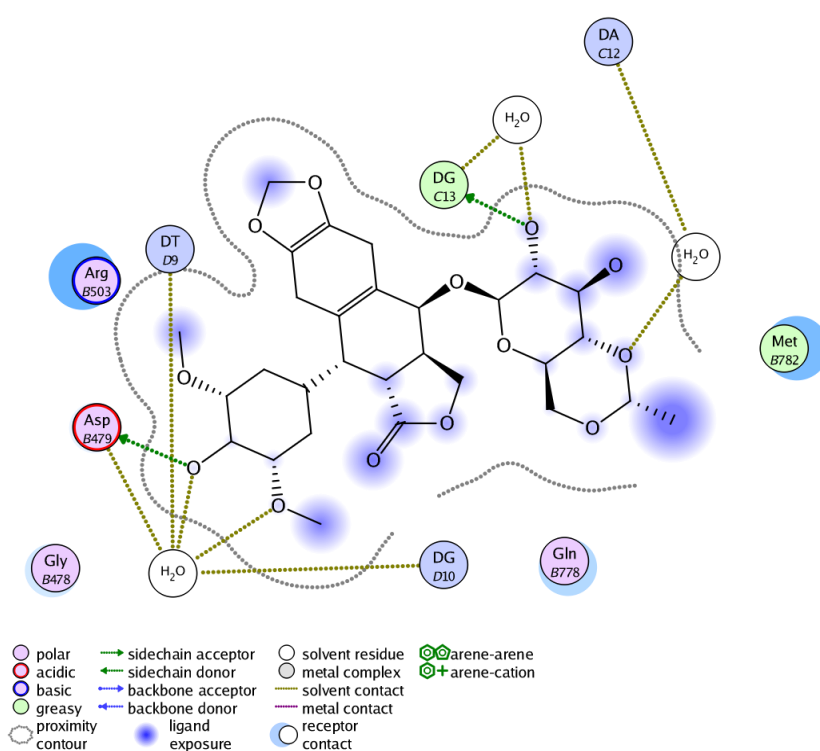


Figura 1. Rappresentazione 2D della molecola dell'Etoposide nel sito attivo dell'enzima della topoisomerasi II. Nell'immagine, ottenuta tramite il programma MOE (*molecular operating environment*), sono mostrate le varie interazioni del farmaco con i vari aminoacidi, le molecole di acqua e le basi azotate del DNA.

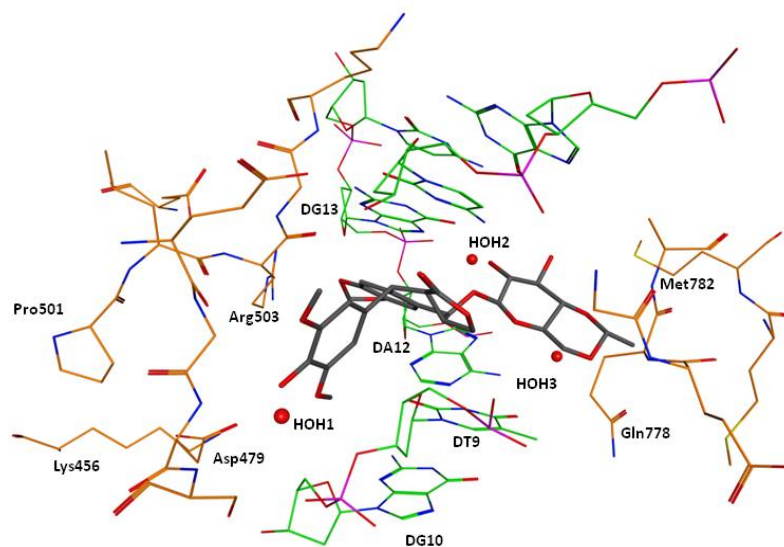


Figura 2. Rappresentazione 3D della molecola dell'Etoposide nel sito attivo dell'enzima della topo isomerasi II.

Nell'immagine, ottenuta tramite programma di modellistica molecolare MOE (Fig. 1 e Fig. 2), sono mostrate le varie interazioni del farmaco con gli aminoacidi come arginina 503, aspartato 479, metionina 782 e glutammina 778, con tre molecole di acqua e con le basi azotate desossiadenuina 12, desossiguanina 13, desossiguanina 10 e desossitimina 9. L'Etoposide induce la morte cellulare provocando una stabilizzazione di un complesso covalente del DNA provocato dall'enzima (noto come il complesso di scissione) che è un intermedio transitorio nel ciclo catalitico della topoisomerasi II. L'accumulo di complessi di scissione in cellule trattate porta alla generazione di interruzioni di filamenti permanenti di DNA che innescano percorsi di ricombinazione/riparo, mutagenesi e traslocazioni cromosomiche: queste interruzioni possono attivare vie di morte cellulare. Quindi, l'Etoposide converte la topoisomerasi II da un enzima essenziale ad una tossina capace di frammentare il genoma (Badwin E.L., et al. 2005).

2. LA CHEMIORESISTENZA

La chemioresistenza è la principale responsabile del fallimento del trattamento clinico della maggior parte delle neoplasie umane (Longley D.B., et al. 2005) e conseguentemente una delle principali cause di morbidità e mortalità del paziente oncologico.

I meccanismi molecolari della chemioresistenza più indagati includono gli alterati livelli di funzionalità di pompe di membrana trasportatrici, le mutazioni di oncogeni ed oncosoppressori, le alterazioni della funzionalità mitocondriale, l'alterato funzionamento nei meccanismi di riparo del DNA, l'autofagia, la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), il rilascio di esosomi, la resistenza allo stress ossidativo e la presenza nella massa tumorale di cellule staminali del cancro (Brasseur K., et al. 2017; Lu C., et al. 2008).

Alterata funzionalità delle pompe trasportatrici

Le proteine *ATP binding cassette* (ABC) sono ATPasi responsabili del trasporto transmembranale di ioni, aminoacidi, peptidi, lipidi, zuccheri e xenobiotici mediante l'utilizzo dell'energia di idrolisi dell'ATP. Questi trasportatori includono le *P-glicoproteine* (P-gp), la *breast cancer resistance protein* (BCRP/ABCG2 o BCP or MXR1) e la *major vault protein* MVP (Sharom F.J., 2008). Un'overespressione della P-gp è stata osservata in differenti tipi di tumori ematici e tumori solidi, come leucemia, neuroblastoma, tumore alla mammella o alle ovaie, ed è stata correlata alla chemioresistenza. Essa è responsabile del trasporto di molti substrati, come colchicina, tacrolimus, chinidina, etoposide, doxorubicina, vinblastina, steroidi, bilirubina, digossina e desametasone, e può avere un'azione detossificante dal momento che è in grado di regolare l'efflusso di farmaci citotossici nelle cellule tumorali ed il trasporto del glutathione (GSH) (Cole S.P., et al. 1992; Han L., et al. 2017).

Le BCRP sono overesprese nella placenta, nell'intestino, nel fegato, nella barriera emato-encefalica, nei progenitori ematopoietici ed in altre cellule staminali, così come nelle cellule staminali del cancro dove possono essere

coinvolte nell'efflusso di farmaci citotossici (mitoxantrone, daunorubicina, doxorubicina, topotecano). Un esempio viene fornito dall'*overexpression* della proteina ABCG2 in cellule tumorali mitoxantrone-resistenti (MCF-7/MX) in cui aumenta la loro tolleranza al farmaco (Chang F.W., et al. 2017).

Le proteine MVP possono mediare la chemioresistenza modulando il trasporto nucleo-citoplasma di ormoni, mRNA e farmaci in cellule di carcinoma polmonare non microcitico (NSCLC), nel linfoma a cellule B e nei gliomi (Slovak M.L., et al. 1995).

Mutazioni di oncogeni e oncosoppressori

Tra gli oncogeni responsabili della chemioresistenza vi è il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) che può attivare le vie di segnalazione JAK/STAT3, PI3K/Akt/mTOR e src/FAK/ROS e SOS/Grb2/Ras, coinvolte nella differenziazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare (Kuroda H., et al. 2010). La sua overespressione può portare all'attivazione dei fattori di trascrizione NF-kB e STAT3, conferendo resistenza del glioma e del carcinoma polmonare al cisplatino, paclitaxel, gemcitabine e pemetrexed (Tang D.G., et al. 2015). Alcuni autori (Kuroda H., et al. 2010) hanno riportato che la resistenza al cisplatino era associata con l'aumentata espressione di eme ossigenasi 1 (HO-1) nelle cellule di cancro del polmone attraverso l'attivazione EGFR-mediata delle vie PI3K/Akt e NF-Kb. Akt è una serina/treonina chinasi coinvolta nell'apoptosi, nella proliferazione e migrazione cellulare e può attivare NF-kB up-regolando la trascrizione di geni pro-sopravvivenza. Cellule di carcinoma polmonare overesprimenti Akt mostravano l'iperespressione della proteina antiapoptotica Bcl-Xl e ritardavano l'attivazione della via p53-dipendente, in seguito all'esposizione al cisplatino (Lu D., et al. 2011). Nel carcinoma ovarico, la resistenza al cisplatino può essere acquisita mediante fosforilazione di BAD da parte di Erk e PI3K/Akt, oppure da una overespressione di Akt1 e un'amplificazione genica di Akt2 che rendeva le cellule altamente resistenti al paclitaxel (Page C., et al. 2000). L'attivazione di Akt, inoltre, può portare alla

chemioresistenza alla doxorubicina nel carcinoma epatico (You M.L., et al. 2017).

Erk1/2 è una proteina chinasi coinvolta nel regolare la meiosi, la mitosi e la fase post-mitotica in seguito alla stimolazione da parte di fattori di crescita, citochine e ligandi per i recettori accoppiati a proteine G. È stato riportato che la mutazione K-Ras è responsabile della resistenza primaria del carcinoma polmonare a gefitinib, erlotinib o sunitinib (Liu Q.H., et al. 2015). La mutazione di N-Ras è coinvolta nella chemioresistenza delle cellule di mieloma (Hoang B., et al. 2006) mentre H-Ras media la resistenza delle cellule di carcinoma ovarico al cisplatino attivando la via di segnalazione di Raf-1/Erk (Zhang P., et al. 2014).

Inoltre, NF-κB è un fattore di trascrizione la cui attività può essere indotta da specie ossidanti (ROS), da citochine come TNFα e IL-1β, dal lipopolisaccaride batterico (LPS), dall'isoproterenolo, dalla cocaina e da agenti di malattia fisici, come le radiazioni ionizzanti, biologici e chimici (Aggarwal B.B., et al. 2009). Un recente studio ha dimostrato che l'attivazione di NF-κB media la resistenza al cisplatino di cellule di carcinoma vescicale che mostravano più aggressività, rapida tumorigenesi e comparsa di transizione epitelio mesenchimale (Sun Y., et al. 2016).

I fenomeni di chemioresistenza possono verificarsi anche con la riduzione dei fenomeni apoptotici o dell'arresto del ciclo cellulare dovuto a mutazioni del gene oncosoppressore p53 (Bush J.A., et al. 2002). P53 è il più frequente dei geni mutati nei tumori umani e la sua quantità varia in risposta ad una varietà di segnali di stress ad esempio danni al DNA, radiazioni ionizzanti o raggi UV (Thottassery J.V., et al. 1997). Dal momento che molti studi dimostrano che alcune forme mutate di p53 hanno un *gain of function*, il fenotipo chemioresistente dei tumori con p53 mutata potrebbe essere la conseguenza di una *upregulation* di ABCB1 (membro della famiglia di P-gp), la cui espressione viene mediata dal legame di p53 mutata con il promotore di ABCB1 (Pfeifer G.P., 2000). Inoltre, mutazioni a carico di p53 inducono la resistenza ai farmaci nelle cellule di cancro mammario o del colon mediante la *downregulation* del miR-223 (Masciarelli S., et al. 2014).

Alterazioni della funzionalità mitocondriale

Il mitocondrio è la sede di produzione energetica della cellula e rappresenta il principale centro delle vie di segnale intracellulari che regolano la progressione tumorale mediante la riprogrammazione metabolica, l'acquisizione della capacità metastatica e la risposta ai chemioterapici (Guerra F., et al. 2017).

Cardenas e coll. hanno trovato che il microambiente adipocitario promuoveva l'espressione della proteina mitocondriale antiapoptotica Bcl-xL conferendo alle cellule di carcinoma ovarico resistenza ai farmaci (Cardenas C., et al. 2017). Inoltre, è stato osservato che le proteine antiapoptotiche Bcl-2 e Bcl-xL sono capaci di aumentare la chemioresistenza del mesotelioma e del cancro alla laringe al cisplatino o alla gemcitabina (Lu D., et al. 2011). Anche l'iper-espressione della Survivina, che appartiene alla famiglia degli inibitori dell'apoptosi (IAP), può essere considerata coinvolta nella risposta ai chemioterapici nei pazienti con mieloma multiplo, linfoma, tumore alla vescica o alle ovaie (Lu D., et al. 2011). La Survivina è strettamente legata all'aumento della resistenza al cisplatino nel tumore della prostata e la sua inibizione era in grado di revertire il fenomeno nel tumore gastrico resistente al doxetaxel (Lu D., et al. 2011).

La maggior parte delle cellule tumorali presenta mutazioni somatiche a carico del DNA mitocondriale (mtDNA) capaci di indurre disfunzioni a carico dei mitocondri. Questi organelli a doppia membrana, oltre a produrre ATP, svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi del calcio, nella regolazione dell'apoptosi e nella produzione e smaltimento dei radicali liberi (Shen J., et al. 2011; Lane N., et al. 2010; Navarro A., et al. 2009; Balaban R.S., et al. 2005). Diverse alterazioni mitocondriali sono correlate con la carcinogenesi e con la progressione neoplastica (Wallace D.C., 2012).

Tra i geni mitocondriali mutati troviamo quelli che codificano per le proteine PGC1alpha (*proliferator-activator receptor gamma co-activator-*

1alpha) e *mitochondrial transcription factor A*, che possono essere considerati marcatori di chemioresistenza nel tumore alle ovaie (Gabrielson M., et al. 2014). La PGC-1beta media anche la resistenza al cisplatino del tumore al polmone (Yao Z., et al. 2013). Inoltre, è stato registrato un aumento dei livelli intracellulari di ATP ed una elevata glicolisi aerobia in cellule di cancro del colon che acquisivano chemioresistenza (Zhou Y., et al. 2012).

Riparo del DNA

Il riparo del DNA è un evento biologico che individua e corregge i danni alle molecole di DNA indotti dalle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) endogene, dalle radiazioni ultraviolette, dai raggi X e γ , dalle tossine vegetali, dagli agenti mutageni e dagli agenti chemioterapici. Esistono due meccanismi di riparo del DNA: riparo mediante escissione nucleotidica (*nucleotide excision repair*, NER) e riparo mediante escissione di base (*base excision repair*, BER), che può conferire la resistenza ai farmaci che colpiscono direttamente il DNA. ERCC1, un enzima della NER, forma il complesso enzimatico ERCC1-XPF che è coinvolto nel riparo del DNA e nei processi di ricombinazione. Un'*overexpression* di ERCC1 è stata correlata alla prognosi infausta di pazienti che ricevevano chemioterapici derivati del platino; a questo riguardo, è stato dimostrato che il cisplatino regolava la via della MAP chinasi (MAPK) inducendo l'*overexpression* di ERCC1 ed aumentando la chemioresistenza del melanoma (Li W., et al. 2012; Nagel Z.D., et al. 2017).

Uno studio di Wickström ha dimostrato che l'O(6)-metilguanina DNA metiltransferasi (MGMT) era overpressa ed induceva sviluppo di chemioresistenza mediante la via di Wnt, la cui inibizione ristabiliva la sensibilità agli agenti alchilanti (Wickström M., et al. 2015).

Inoltre, un insufficiente riparo del DNA è stato coinvolto nella chemioresistenza al cisplatino di cellule di carcinoma squamoso della cavità orale attraverso l'attività di Wip1, che è una fosfatasi in grado di inibire la via del segnale dipendente dalla chinasi ATM (Wang L., et al. 2012).

Autofagia

L'autofagia viene attivata quando vi è necessità di degradare gli organelli subcellulari o altre parti della cellula danneggiate al fine di riciclare aminoacidi o acidi grassi attraverso la formazione di autofagosomi. Esistono quattro vie che portano all'autofagia, di cui la macroautofagia, la microautofagia, l'autofagia mediata da molecole *chaperons* e la mitofagia. Lo stress a cui è sottoposta la cellula o l'aumento della domanda metabolica attivano l'autofagia, che può promuovere la sopravvivenza cellulare e causare crescita tumorale e resistenza ai farmaci.

Pertanto, l'inibizione autofagica mediante l'utilizzo di idrossiclorochina (HCQ) o dei suoi derivati ripristina la chemiosensibilità ed aumenta la morte delle cellule tumorali (Ojha R., et al. 2015).

Beclin-1, che funziona come proteina *scaffold* per la formazione dell'autofagosoma, è stata trovata altamente espressa nel neuroblastoma (Ojha R., et al. 2015). Inoltre, è stato riportato che la doxorubicina, il cisplatino e l'Etoposide inducevano l'espressione e la traslocazione citosolica della proteina *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) aumentando l'autofagia via Beclin-1 nelle cellule di neuroblastoma (Wang L., et al. 2015).

Xu e coll. hanno dimostrato che il silenziamento di miRNA-30a attivava l'autofagia mediata da Beclin-1 favorendo la chemioresistenza di cellule di osteosarcoma (Xu R., et al. 2016).

Esosomi

Gli esosomi sono delle microvescicole di 30-100 nm che si possono ritrovare nel sangue, nelle urine, nei mezzi di coltura e possono contenere macromolecole, come frammenti di DNA, mRNA, proteine e microRNA. Possono essere rilasciati dalle cellule quando dei corpi multivescicolari si fondono con la membrana plasmatica o rilasciate direttamente da essa e possono mediare la comunicazione cellula-cellula. Il contenuto degli esosomi derivati dalle cellule tumorali e dai fibroblasti associati al tumore (CAF) può essere trasportato nel circolo sanguigno e quindi controllare un

ampio range di vie di segnalazione responsabili della crescita tumorale, della formazione di metastasi, dell'angiogenesi e della resistenza ai farmaci. (Wang Z., et al. 2016). E' stato riportato in letteratura che gli esosomi derivati dal tumore mammario potrebbero mediare la chemioresistenza attraverso il trasferimento delle proteine di trasporto dei farmaci MDR-1 e P-gp. Inoltre, l'esposizione al paclitaxel induceva le cellule del tumore mammario a generare esosomi contenenti la Survivina, responsabile di aumentare la sopravvivenza delle cellule tumorali (Kreger B.T., et al. 2016). Ancora, il recettore canale, TRPC5, che media la chemioresistenza veniva rilasciato e trasferito da cellule cancerose chemio-sensibili attraverso il rilascio di esosomi (Wang T., et al. 2017).

Transizione Epitelio-Mesenchimale

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è un processo in seguito al quale le cellule epiteliali perdono la polarità, la capacità adesiva e guadagnano proprietà migratorie ed invasive diventando cellule staminali mesenchimali (Dong X., et al. 2016; Shteingauz A., et al. 2015). Questa trasformazione delle cellule epiteliali in cellule mesenchimali causa una riduzione delle adesioni cellula-cellula, aumentando le caratteristiche di staminalità e la generazione di quelle che sono definite cellule staminali del cancro (CSC) (Marjanovic N.D., et al. 2013; Mani S.A., et al. 2008).

Le vie di segnalazione coinvolte nella staminalità come Wnt/beta-catenina e Hedgehog sono associati con un incremento del fenotipo EMT con caratteristiche di motilità ed invasività, resistenza all'apoptosi e con un incremento di auto-rinnovamento e di differenziamento (Ye X., et al. 2015). Inoltre, il processo opposto, la transizione mesenchimo-epiteliale (MET), con un incremento delle adesioni cellula-cellula, può aumentare le proprietà di colonizzazione in organi distanti rispetto al sito del tumore primario, aumentando la capacità di iniziazione tumorale in altri distretti corporei (Yao D., et al. 2011) (Fig. 3).

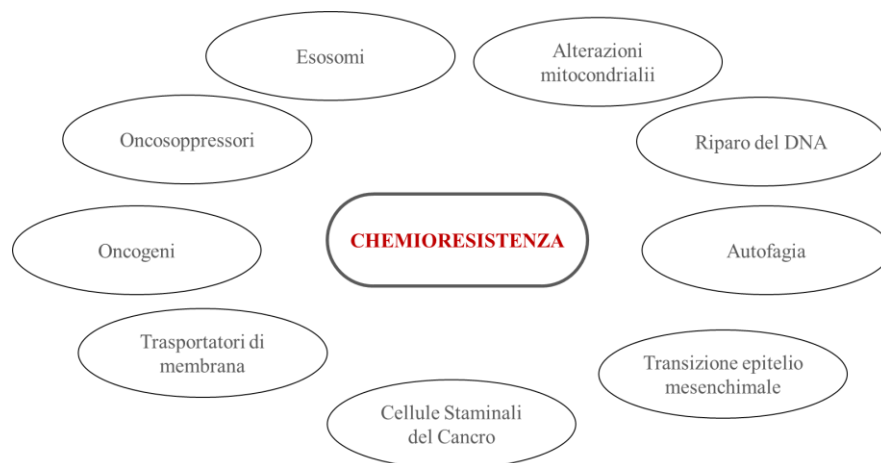


Figura 3. Meccanismi che supportano la multiresistenza ai farmaci.

E' stato riportato che l'*overexpression* di un gene della staminalità Nanog induceva EMT di cellule di carcinoma ovarico sviluppando in esse una bassa sensibilità al cisplatino mediante attivazione della via di STAT3 e *upregulation* di MDR-1 (*multidrug resistance-1*) e GST- π (glutathione transferasi) (Liu S., et al. 2016). Inoltre, la chemioresistenza alla doxorubicina induceva EMT di cellule di carcinoma del colon attraverso la *up-regulation* della via dipendente da TGF- β (Li J., et al. 2015). Hu e coll. hanno trovato che il miR-760 favoriva la chemiosensibilità di cellule di adenocarcinoma mammario alla doxorubicina attraverso l'inibizione della EMT (Hu S.H., et al. 2016); invece la *dowregulation* del miR-203 era responsabile della chemioresistenza del glioblastoma promuovendo EMT attraverso Snail2 (Liao H., et al. 2015).

3. LE CELLULE STAMINALI DEL CANCRO

L'ipotesi della presenza delle cellule staminali del cancro (CSC) ha preso sempre più campo a partire dagli anni '90 quando si dimostrò che solo una piccola popolazione di cellule leucemiche, con un determinato fenotipo, potevano causare il cancro dopo essere state inoculate in topi

immunodeficienti (Lapidot T., et al. 1994). Da questo momento in poi, sono state studiate in neoplasie mammarie, tumori cerebrali, polmonari, del colon, delle ovaie, del pancreas, della prostata e della tiroide (Pacini N., et al. 2014). Inoltre, è stata confermata l'ipotesi che questa sotto-popolazione di cellule supporti la crescita del tumore e sia la causa della chemioresistenza (Xia T., et al. 2012). Quindi, capire e studiare la biologia delle CSC e capire come questa sottopopolazione possa contribuire alla progressione del cancro sta assumendo un'importanza sempre più rilevante date le potenziali ricadute che possono esserci in ambito clinico (Lathia J.D., et al. 2017).

Modello stocastico o clonale e modello gerarchico delle CSC

Il primo modello utilizzato per spiegare lo sviluppo tumorale è quello stocastico, anche chiamato evoluzione clonale, che sostiene che ogni singola cellula del tumore abbia lo stesso potenziale di dare origine ad un nuovo tumore. In questo modello, con il tempo si ha l'acquisizione di mutazioni e di alterazioni epigenetiche che portano i cloni cellulari ad acquisire caratteristiche di malignità e il tumore ad avere una popolazione cellulare eterogenea. Inoltre, attraverso questo meccanismo le cellule diventano invasive, sviluppano metastasi in siti distanti dal tumore primario, superano la sorveglianza immunitaria e acquistano una resistenza alla terapia portando alle recidive del tumore (Meacham C.E., et al. 2013) (Fig. 4).

Il modello gerarchico invece ipotizza che solamente una sotto-popolazione di CSC siano responsabili dello sviluppo del tumore e del comportamento maligno delle cellule tumorali, inclusi invasione e metastasi (Reya T., et al. 2001). Nonostante ciò, i due modelli non si escludono a vicenda e non sono necessariamente contraddittori (Pacini N., et al. 2014). Questi due modelli hanno differenti implicazioni per la risposta terapeutica. Secondo il modello clonale per ottenere una risposta duratura è necessario eliminare con la terapia tutti i cloni che hanno la capacità di invadere e metastatizzare. Invece, secondo il modello delle CSC viene richiesta una terapia capace di sensibilizzare e uccidere tutte le CSC, che hanno la capacità di far propagare

il tumore. Le cellule all'interno della massa tumorale sono eterogenee e possono differire nella loro morfologia, a livello genetico, nei marcatori di superficie, nella cinetica di proliferazione, nella tumorigenicità e nella risposta alle terapie (Tang D.G., 2012).

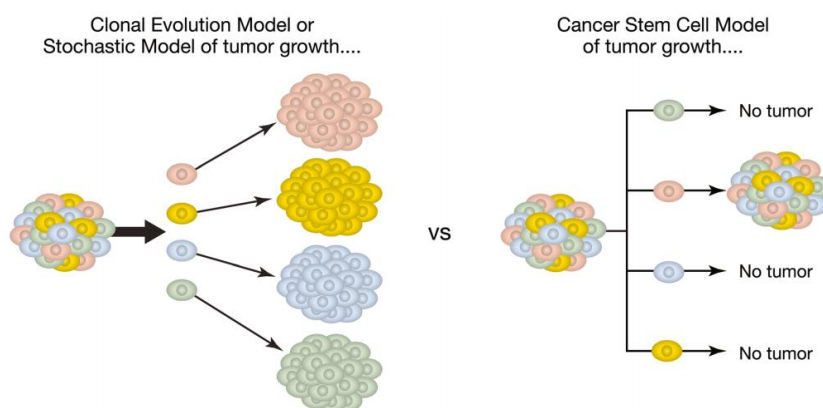


Figura 4. Modelli di progressione neoplastica: il modello stocastico ed il modello gerarchico delle cellule staminali (Lathia J.D., et al. 2017).

3.1 Cellule staminali e Cellule Staminali del Cancro

Le cellule staminali sono presenti in tutti gli organi e tessuti e sono responsabili dei processi di rigenerazione. Esistono due tipi di cellule staminali: cellule staminali embrionali e cellule staminali somatiche (anche chiamate cellule staminali adulte). Le cellule staminali embrionali derivano dalle divisioni precoci della cellula uovo fecondata e danno origine a tutte le cellule che contribuiscono allo sviluppo dell'organismo. Invece, le cellule staminali somatiche sono usualmente presenti in tutti i tessuti già sviluppati e negli organi e la loro funzione primaria è quella di mantenere l'integrità e riparare i tessuti e gli organi danneggiati. Le proprietà di base delle cellule staminali sono quindi di auto-rinnovamento e di capacità di dare origine a cellule differenziate multiple. La capacità di auto-rinnovamento rende tali cellule capaci di rigenerare non solo se stesse, ma anche i tessuti. L'abilità di differenziarsi conferisce loro la capacità di dare origine a cellule con proprietà specializzate necessarie per le funzioni degli organi. Nel momento in cui le cellule staminali si differenziano, perdono la loro capacità di agire

come cellule staminali. Questi cambiamenti stabiliscono una gerarchia di popolazioni cellulari che sono alla base dell'organogenesi (Gao J.X., 2008; Verga Falzacappa M.V., et al. 2012).

Le cellule staminali rimangono nella fase G0 del ciclo cellulare per lunghi periodi ed in tale fase possono essere soggette a mutazioni genetiche e/o epigenetiche causate dagli agenti mutageni oppure dalla *downregulation* di varie vie di segnalazione che alterano il loro microambiente. Inoltre, una mutazione genetica o un cambiamento epigenetico a carico delle cellule staminali può essere dannoso poichè tali modifiche saranno poi ereditate alle cellule figlie.

Nei tessuti, l'omeostasi interna è mantenuta attraverso un equilibrio tra l'auto-rinnovamento e il differenziamento che mantiene costante il numero di cellule differenziate nei tessuti (Molofsky A.V., et al. 2004; Spradling A., et al. 2001). Questo equilibrio richiede che la normale popolazione di cellule staminali sia mantenuta entro un numero preciso attraverso la regolazione della divisione cellulare simmetrica e asimmetrica. Come già detto in precedenza, le cellule staminali, essendo bloccate nella fase G0, hanno un ciclo cellulare più lungo rispetto alle cellule normali (Molofsky A.V., et al. 2004). Questa proprietà rende le cellule staminali quiescenti e può essere un meccanismo attraverso cui tali cellule sono protette da mutazioni che potrebbero verificarsi a carico del DNA durante la divisione cellulare (Cheung T.H., et al. 2013).

Le cellule staminali hanno un tipico metabolismo glicolitico con ridotti livelli di ATP intracellulare e di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Siggins R.W., et al. 2008; Kondoh H., et al. 2007). È stato dimostrato che un passaggio dalla staminalità ad uno stato differenziato porta ad un recupero della fosforilazione ossidativa e della biogenesi mitocondriale con un incremento della produzione dei ROS (Chen C.T., et al. 2008).

Anche nei tumori sono state identificate le cellule staminali che risiedono all'interno di microambienti specializzati o nicchie. Le cellule staminali del cancro (CSC) e le cellule staminali adulte hanno molte caratteristiche in comune: l'abilità di autorinnovamento, la competenza alla differenziazione,

l'espressione della telomerasi attiva, l'attivazione di vie di segnale anti-apoptotiche, un incremento attivo dei trasporti membranali e la capacità di migrazione (Wicha M.S., et al. 2006).

Sebbene le CSC abbiano la capacità di auto-rinnovamento, i processi coinvolti in questo meccanismo sono disregolati con un incremento delle divisioni cellulari simmetriche (che producono due cellule staminali figlie) rispetto alle divisioni asimmetriche (che danno origine a una cellula staminale figlia ed una differenziata, Boman B.M., et al. 2007). Molte CSC sono portatrici di mutazioni e cambiamenti epigenetici, che possono indurre delle alterazioni nelle vie di segnale coinvolte nello sviluppo embrionale (Wnt/beta-catenina, Hedgehog, Notch). Le CSC differiscono funzionalmente dalle cellule staminali adulte ma possono esprimere marcatori di staminalità in comune, in particolare quelli di superficie.

3.2 Identificazione delle CSC nei tumori

L'identificazione delle CSC nella massa tumorale è stata a lungo studiata ed oggi è possibile riconoscere specificamente tale popolazione cellulare mediante il riconoscimento di specifici marcatori di superficie come CD44, CD24, CD133 o la valutazione dell'attività di enzimi come l'aldeide-deidrogenasi (ALDH) (Lathia J.D., et al. 2017). Ad esempio è stato dimostrato che le CSC del tumore alla mammella mostrano un fenotipo ESA+CD44+ e CD24-(low) mentre quelle leucemiche hanno un fenotipo CD34+ CD38- e possono presentare altri marcatori tra cui CD123, TIM3, CD47 e CD96 (Wang X., et al. 2017). Le CSC costituiscono una popolazione cellulare estremamente eterogenea dotata di elevata plasticità che consente di dividerle in due tipologie fondamentali: epiteliale e mesenchimale. Le CSC di tipo mesenchimale sono capaci di dare metastasi e mostrano fenotipi CD24-/CD44+, sono quiescenti e molto presenti nel fronte invasivo del tumore (Liu S., et al. 2013). Le CSC di tipo epiteliale, invece, esprimono maggiormente l'ALDH, sono molto proliferative e sono localizzate nella parte interna del tumore. L'alternanza tra questi due stati sembra essere correlata alla capacità del tumore di invadere lo stroma

circostante e di metastatizzare in vari distretti corporei (Liu S., et al. 2013). Nel tumore alla mammella, è stata evidenziata una sottocategoria di CSC che esprimono delle varianti di CD44 (CD44v); esse possiedono una elevata capacità di metastatizzare nei polmoni e ciò correla con una prognosi sfavorevole (Hu J., et al. 2017). Inoltre, le CSC del carcinoma ovarico esprimono CXCR4 e CD133 ed overesprimono ABCG2 acquisendo resistenza al cisplatino (Cioffi M., et al. 2015).

Anche per il neuroblastoma è stata riportata la presenza di neurosfere, ovvero CSC di origine neuronale, che sono state rilevate sia nelle biopsie che nelle linee cellulari stabilizzate (Hirschmann-Jax C., et al. 2004). Le CSC del neuroblastoma mostrano l'espressione di marcatori di membrana come CD114 e CD133 (Walton J.D., et al. 2004; Alisi A., et al. 2013), la nestina e la proteina di trasporto ABCG2 (Neradil J., et al. 2015; Islam M.O., et al. 2005). CD133, o prominina-1, è una glicoproteina localizzata nella membrana plasmatica con funzioni non ancora chiare e la sua espressione è stata dimostrata in oltre 20 linee di neuroblastoma umano. Altri studi hanno dimostrato che le CSC di neuroblastoma mostravano un'alta espressione di GD2 e c-kit/117, fattori comuni ai progenitori delle cellule della cresta neurale (Hirschmann-Jax C., et al. 2004).

3.3 CSC e resistenza alle terapie

La resistenza agli agenti chemioterapici ed alla radioterapia è una caratteristica delle CSC che, come le cellule staminali adulte, sono relativamente quiescenti, lentamente proliferanti e possiedono diversi meccanismi di multi-resistenza tra cui l'aumentata espressione di proteine di trasporto ABC e di proteine anti-apoptotiche (Zeuner A., et al. 2014) ed una elevata capacità di riparare il DNA (Vidal S.J., et al. 2014). I farmaci citostatici tradizionali, come gli agenti alchilanti, sono attivi sulla massa neoplastica ma meno sulle CSC che hanno una lenta proliferazione (Curtin J.C., et al. 2010; Reya T., et al. 2001; Sell S., 2010; Abu D.R., et al. 2012). Quindi, le terapie convenzionali possono contribuire ad aumentare la frazione delle CSC all'interno della massa tumorale e ristabilire la crescita

del tumore portando ad un incremento del fenotipo maligno (Dawood S., et al. 2014).

Inoltre, gli stimoli che derivano dal microambiente in cui risiedono le CSC possono indurre un altro meccanismo di resistenza: infatti le CSC risiedono in una nicchia caratterizzata dalla presenza di cellule di supporto, tra cui cellule endoteliali vasali, mesenchimali e cellule infiammatorie che provvedono a rifornire alle CSC i fattori che sostengono la sopravvivenza e la crescita, contribuendo all'instaurarsi di una chemioresistenza innata o adattativa (Borovski T., et al. 2013; Calabrese C., et al. 2007). L'*overexpression* di Bcl2, nota proteina anti-apoptotica, è stata osservata nelle CSC del cancro mammario e della prostata ed è stata dimostrata essere coinvolta nei meccanismi di chemioresistenza (Domingo-Domenech J., et al. 2012; Lang J.Y., et al. 2011). Inoltre, nel tumore ovarico, le CSC overesprimono i trasportatori ABC, tra cui ABCC1 e ABCG2. e diventano molto resistenti al paclitaxel (Boesch M., et al. 2014). Infatti, esistono studi pre-clinici in cui inibitori dei trasportatori ABC sono combinati con la chemioterapia in diversi tipi di tumore tra cui il cancro pancreatico (Zhao L., et al. 2016). Altri fattori che contribuiscono alla chemioresistenza delle CSC sono l'attivazione dei meccanismi di riparo dei danni del DNA, la presenza di vari meccanismi epigenetici (miRNA, metilazione del DNA o degli istoni) ed il mantenimento di bassi livelli di specie reattive dell'ossigeno (Lu H., et al. 2013).

Tra i meccanismi epigenetici, è oggetto di recenti studi il ruolo dei miRNA nel regolare le CSC. Nel tumore alla prostata, è stato osservato che il miRNA-34a, reprimendo l'espressione del marcatore di staminalità CD44, inibisce la crescita delle CSC e la formazione di metastasi (Liu C., et al. 2011). Altri miRNA, come Let-7 e miR200, inibiscono l'auto-rinnovamento e il differenziamento delle CSC nel tumore mammario (Yu F., et al. 2007; Iliopoulos D., et al. 2010).

3.4 Metabolismo delle CSC

Effetto Warburg e metabolismo delle cellule tumorali

La proliferazione cellulare è richiesta per l'embriogenesi, la crescita, le funzioni proprie di molti tessuti adulti, la rigenerazione ed anche per la tumorigenesi. (DeBerardinis R.J., et al. 2008). Tutte le cellule richiedono energia per crescere, dividersi e sopravvivere e tale l'energia viene ricavata dall'assorbimento di nutrienti tra cui *in primis* il glucosio che viene metabolizzato tramite la glicolisi e la respirazione cellulare (Snyder V., et al. 2018). La glicolisi produce piruvato, che, in condizioni normali di ossigeno, è trasportato nei mitocondri dove viene convertito in AcetilCoA, che a sua volta entra nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) o Ciclo di Krebs per generare 34 molecole di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) (Sancho P., et al. 2016). Dal momento che il metabolismo ossidativo produce più molecole di ATP rispetto alla glicolisi anaerobia le cellule normali in condizioni di normossia prediligono il metabolismo ossidativo.

In condizioni di ridotta quantità di ossigeno, le cellule tumorali, scelgono di consumare il glucosio in maniera anaerobia e producono lattato. Questo fenomeno è detto "effetto Warburg" e prende il nome da Otto Heinrich Warburg, il ricercatore che per primo descrisse questo fenomeno (Warburg O., et al. 1927; Fig. 5).

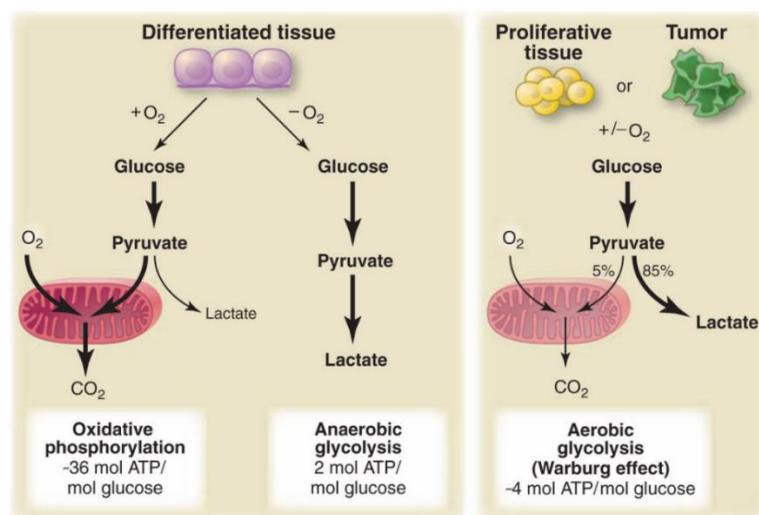


Figura 5. Effetto Warburg nel cancro (Vander Heiden M.G. et al., 2009).

Tale effetto Warburg, osservato nelle cellule neoplastiche, è stato inizialmente imputato ad un deficit permanente del metabolismo ossidativo che portava ad un aumento della glicolisi anaerobia e quindi del consumo di glucosio, per compensare l'apporto di energia. In seguito si osservò che molte delle cellule neoplastiche altamente proliferanti non presentavano danni a carico del metabolismo ossidativo (Moreno-Sanchez R., et al. 2007) ma la glicolisi anaerobia era presente ugualmente con un elevato rilascio di lattato. Rimane un po' controverso il motivo per cui il tasso di rilascio di lattato sia così alto quando gran parte del piruvato potrebbe essere ossidato per produrre maggiori livelli di ATP.

A questo riguardo, è da tenere presente che l'ossidazione del piruvato richiede il suo trasporto nella matrice mitocondriale con un processo regolato da enzimi come il complesso della piruvato deidrogenasi (PDH), la cui attività è influenzata da reazioni di fosforilazione, dai livelli di CoA liberi e dal rapporto NAD^+/NADH . Durante la proliferazione cellulare, il flusso glicolitico può eccedere la velocità massima di attivazione della PDH (Curi R., et al. 1988) e l'espressione della lattato deidrogenasi è in grado di rigenerare il NAD^+ mentre continua il flusso glicolitico, con la produzione di lattato, che può essere secreto. È stato osservato nelle cellule neoplastiche che la LDH può essere indotta da oncogeni come c-myc e HER2/neu (Fantin V.E., et al. 2006).

Nella proliferazione cellulare viene anche richiesta una elevata biosintesi di nucleotidi per la replicazione del genoma e questo processo è altamente dipendente dai flussi di glucosio, glutamina e di molti aminoacidi non essenziali (DeBerardinis R.J., et al. 2008). La famiglia dei geni *myc* (c-myc, L-myc, s-Myc e N-myc) è comunemente amplificata nei tumori umani e codifica per i fattori di trascrizione che regolano la crescita e il ciclo cellulare, mediante l'induzione dell'espressione di geni richiesti per tali processi. Tra i geni indotti da c-myc, oltre a quello che codifica per la LDH-A (Osthus R.C., et al. 2000), sono inclusi quelli che codificano per gli enzimi glicolitici e gli enzimi coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi (DeBerardinis R.J., et al. 2008).

Inoltre, l'espressione dei trasportatori del glucosio, degli enzimi glicolitici e della LDH-1 (O'Rourke J.F., et al. 1996) è stimolata anche dal complesso di trascrizione *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1), la cui attività incrementa in condizioni di ipossia. Infatti, in tali condizioni, HIF1 α (subunità di HIF) non viene associata al fattore di soppressione tumorale *Von Hippel-Lindau* (VHL), come normalmente avviene in condizioni di normossia, portando alla stabilizzazione di tale subunità che, formando un eterodimero con la subunità HIF1 β , trasloca al nucleo e modula la trascrizione genica (Brunelle J.K., et al. 2005).

E' noto che l'attivazione della via PI3K/Akt/mTOR nelle cellule tumorali è in grado di aumentare le attività metaboliche dal momento che permette una maggiore espressione sulla membrana plasmatica di trasportatori capaci di facilitare l'*uptake* di glucosio, aminoacidi e altri nutrienti (Barata J.T., et al. 2004; Elstrom R.L., et al. 2004).

Una disregolazione del metabolismo nei tumori sembra essere messa in relazione con la resistenza ai chemioterapici (Zhao Y., et al. 2011). È stato riportato che la LDH-A contribuisce alla resistenza al paclitaxel/trastuzumab nel tumore mammario, mentre la piruvato deidrogenasi chinasi 3 (PDK3) contribuisce alla resistenza indotta da ipossia nel cancro alla cervice uterina e al colon. Nel tumore della mammella, l'espressione della *Fatty Acid Synthase* (FASN), un complesso enzimatico che catalizza la sintesi degli acidi grassi, è messa in relazione alla resistenza acquisita al docetaxel/trastuzumab/adriamycin, alla resistenza intrinseca alla gemcitabina e alle radiazioni. Infine, nel tumore gastrico la glutamminolisi può essere correlata alla resistenza al cisplatino attraverso l'attivazione del *rapamycin complex 1* (mTORC1) (Zhao Y., et al. 2013).

Alterazioni metaboliche nelle CSC

Inizialmente si era ipotizzato che le CSC avessero un metabolismo fondamentalmente glicolitico, simile a quello delle cellule staminali multipotenti dei tessuti normali, mentre le cellule somatiche possedevano un metabolismo ossidativo (Folmes C.D., et al. 2012). Un simile modello è

stato osservato nelle cellule staminali pluripotenti indotte (iPS), dove il processo di riprogrammazione è associato con uno *switch* dal metabolismo ossidativo a quello glicolitico, che è necessario per acquisire lo stato di pluripotenza (Fig. 5). Queste osservazioni confermano infatti che il fenotipo metabolico e quello staminale sono strettamente collegati ed il metabolismo controlla la staminalità. L'attivazione del programma glicolitico favorisce la staminalità attraverso diversi meccanismi, inclusi quelli antiossidanti (Sancho P., et al. 2016). Per esempio, lo *switch* metabolico è stato osservato nelle CSC del tumore alla mammella, nel carcinoma nasofaringeo e nel carcinoma epatocellulare (Dong C., et al. 2013; Shen Y.A., et al. 2013; Chen C.L. et al. 2016). Inoltre, l'elevata espressione dell'oncogene MYC è stata identificata come uno dei fattori determinanti della staminalità ed è il punto di congiunzione tra glicolisi e staminalità (Sancho P., et al. 2016). Sorprendentemente si è osservato che le CSC del tumore al polmone, del glioblastoma e dell'adenocarcinoma pancreatico dipendono per la produzione di energia dal metabolismo OXPHOS (Sancho P., et al. 2016). Oltre al glucosio, le CSC possono dipendere per la produzione di ATP e di NADPH dall'ossidazione degli acidi grassi (FAO). Ad esempio, l'auto-rinnovamento delle CSC delle cellule ematopoietiche e leucemiche sembra dipendere da FAO (Samudio I., et al. 2010), processo metabolico che sostiene la produzione di ATP e la sopravvivenza delle cellule tumorali (Schafer Z.T., et al. 2009). Inoltre, in cellule di epatocarcinoma è stato osservato che i fattori di pluripotenza promuovono il programma metabolico tumorigenico e chemioresistente, inducendo direttamente l'espressione dei geni FAO (Chen C.L., et al. 2016). Il metabolismo OXPHOS incrementa la resistenza alla deprivazione dei nutrienti e le CSC, dipendenti da OXPHOS, possono quindi acquisire un vantaggio selettivo nel microambiente tumorale in assenza di nutrienti.

L'incremento del numero di mitocondri è un indice di elevata biogenesi di tale organilli e in molti tipi di tumori può essere messa in relazione con l'aumento della chemioresistenza e dell'auto-rinnovamento. Questa plasticità metabolica è dispendiosa per garantire *in vivo* l'auto-rinnovamento

ed il potenziale tumorigenico e suggerisce l'instaurarsi di un delicato equilibrio tra staminalità e metabolismo (Sancho P., et al. 2016).

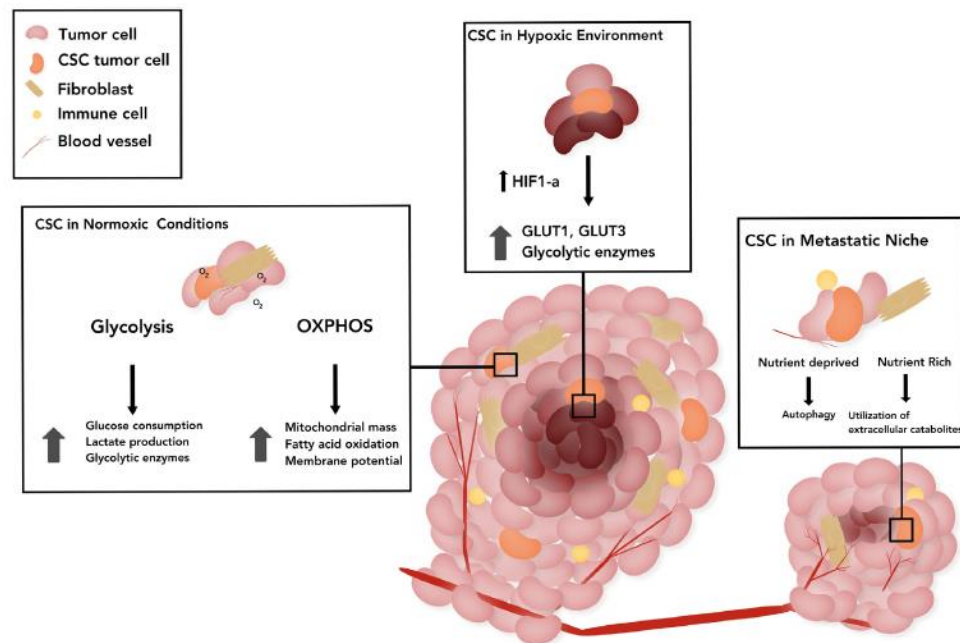


Figura 5. Stato metabolico delle CSC (Snyder V. et al, 2018).

3.5 Stato ossidativo delle CSC

La modulazione dei livelli di ROS intracellulari è cruciale per l'omeostasi cellulare: a livelli bassi e moderati, le ROS possono fungere da molecole segnale in grado di mediare la proliferazione e la differenziazione cellulare (Janssen-Heininger Y.M.W., et al. 2008) mentre a livelli elevati, le ROS provocano danno cellulare e morte (Traverso N., et al. 2013).

Ruolo della regolazione redox nelle CSC

L'aumento delle ROS nelle cellule tumorali è dovuta principalmente all'aumento delle attività metaboliche dovute all'attivazione degli oncogeni, al signaling mediato dalle citochine, all'aumento di attività di enzimi che producono ROS come la NADPH ossidasi (NOX), la ciclossigenasi e le lipossigenasi (Denicola G.M., et al. 2011; Thannickal V.J., et al. 2000; Bedard K., et al. 2007) (Fig. 6). Nel tumore, la presenza delle ROS può

anche essere di origine esogena, poiché le cellule infiammatorie che infiltrano il tumore, come i macrofagi e i neutrofili, generano ROS in seguito ad attivazione di NOX (Gregory A.D., et al. 2011).

E' noto che molti agenti chemioterapici, incluse le antracicline e i derivati del platino, possono indurre il loro effetto tossico attraverso la generazione di ROS (Conklin K.A., 2004). Le cellule tumorali che sono frequentemente esposte ad alti livelli di ROS, endogeni ed esogeni, richiedono sistemi antiossidanti altamente efficienti per la sopravvivenza *in vivo* (Nagano O., et al. 2013).

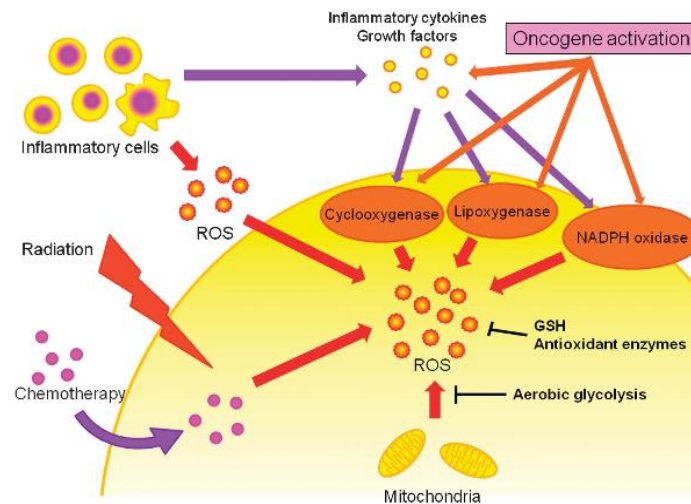


Figura 6. Siti intracellulari di produzione di ROS nelle CSC
(Nagano O. et al., 2013).

Antiossidanti

Gli antiossidanti, che svolgono un ruolo importante nell'omeostasi delle ROS, sono rappresentati dalle vitamine A, C ed E, da sistemi enzimatici come la superossido dismutasi, la glutazione perossidasi, la glutazione reduttasi e la catalasi e da molecole antiossidanti tra cui il GSH, il coenzima Q, la ferritina e la bilirubina (Marengo B., et al. 2016).

Superossido dismutasi

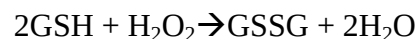
Le superossido dismutasi (SOD) sono enzimi antiossidanti che catalizzano una reazione di dismutazione che converte il superossido in ossigeno e

perossido di idrogeno. Nei mammiferi sono presenti tre isoforme dell'enzima SOD (SOD-1, SOD-2 e SOD-3): tutte hanno la caratteristica di avere un metallo di transizione redox nel loro sito catalitico necessario per catalizzare la reazione di dismutazione (Culotta V.C., et al. 2006).

Il superossido ($O_2^{\bullet-}$) è un potente agente ossidante capace di determinare danni a DNA, lipidi e proteine. L'eccesso di superossido ha un ruolo nella patogenesi di molte condizioni patologiche tra cui neoplasie e malattie neurodegenerative (Warner H.R., 1994; Fukai T., et al. 2011; Miao L., et al. 2009). E' stato riportato che mutazioni di SOD che comportano la perdita di funzione dell'enzima predispongono al cancro del polmone, del colon e del sistema linfatico.

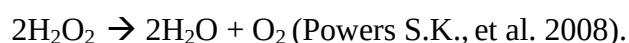
Glutathione Perossidasi

La Glutathione Perossidasi è un enzima fondamentale nella detossificazione del perossido di idrogeno. Nei mammiferi sono state identificate cinque isoforme (GPX-1-GPX-5), le quali differiscono tra loro per localizzazione cellulare e tissutale (Brigelius-Flohe R., 1999). Questi enzimi convertono H_2O_2 o gli idroperossidi organici ad acqua o alcoli attraverso l'ossidazione del GSH.



Catalasi

La Catalasi è un enzima la cui funzione principale è quella di eliminare il perossido di idrogeno catalizzando la sua dismutazione ad ossigeno e acqua attraverso una reazione composta da due passaggi. La reazione netta finale è:



Glutatione-S-Transferasi

Un altro enzima coinvolto nella detossificazione di substrati ossidati è la Glutatione-S-transferasi (GST-transferasi) che catalizza la coniugazione del GSH direttamente ai substrati ossidati che vengono poi eliminati. Nell'uomo e nei mammiferi sono state identificate sette diverse classi di glutathione S-transferasi appartenenti ad un'unica famiglia di enzimi citosolici e, recentemente, sono state identificate altre due famiglie di enzimi a localizzazione mitocondriale e microsomiale (Hayes J.D., et al. 2005).

Glutatione

Il glutathione è un tripeptide, composto da cisteina, glicina e acido glutammico, che si trova in concentrazioni millimolari nella maggior parte delle cellule e principalmente a livello epatico (Traverso N., et al. 2013) (Fig. 7).

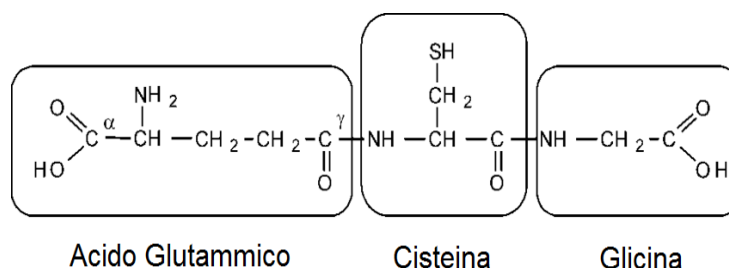


Figura 7. Glutatione (GSH). E' un tripeptide costituito da: acido glutammico, cisteina e glicina.

Il glutathione esiste nelle cellule in 2 stati: ridotto (GSH) ed ossidato (GSSG) ed il rapporto tra GSH e GSSG determina lo stato redox cellulare: le cellule normali a riposo hanno un rapporto GSH/GSSG > 100, mentre il rapporto scende tra 1 e 10 nelle cellule sottoposte a danno ossidativo.

La forma normalmente presente a livello cellulare è quella ridotta e può essere in concentrazioni variabili, mentre il contenuto di GSSG è minore dell'1% del GSH. All'interno delle cellule circa il 90% del GSH è presente a livello citosolico, poco meno del 10% nei mitocondri ed una piccola percentuale nel reticolo endoplasmatico (Lu S.C., 2009). In molti tessuti il

GSH si trova a concentrazioni di 1-10 mM, mentre nel plasma le concentrazioni sono relativamente basse (0.01 mM) perché va incontro ad un rapido metabolismo (Franco R., et al. 2007).

L'omeostasi ed il mantenimento dei livelli di GSH avviene grazie a tre reazioni: 1) sintesi *de novo* del tripeptide attraverso un processo in 2 fasi catalizzato dagli enzimi γ -glutamylcisteina-ligasi (GCL) e dalla GSH-sintetasi, in presenza di ATP; 2) rigenerazione del GSSG (forma ossidata) a GSH (forma ridotta) mediante l'enzima GSH-reduttasi che richiede NADPH e 3) il riciclaggio di cisteina dal GSH coniugato tramite intervento della γ -glutamyltranspeptidasi (γ -GTP) che richiede NADPH.

La sintesi *de novo* del GSH richiede due reazioni enzimatiche ATP-dipendenti: la formazione della γ -glutamylcisteina a partire da glutammato e cisteina, e la formazione del GSH a partire dalla γ -glutamylcisteina e glicina (Fig. 8). La prima reazione è catalizzata dalla γ -glutamylcisteina sintetasi (GCL), costituita da una catena pesante o catalitica (GCLC di circa 73 kDa) e da una catena leggera (GCLM, di circa 31 kDa) (Gipp J.J., et al. 1992). Lo stato redox cellulare può influenzare l'attività della GCL attraverso l'assemblaggio dell'oloenzima, che può essere dissociato reversibilmente. La formazione dell'oloenzima viene aumentata in caso di stress ossidativo, incrementando anche l'attività della GCL (Richman P.G., et al. 1975). La seconda reazione per la sintesi del GSH è catalizzata dalla GSH sintetasi (GS), che è composta da due subunità identiche (118 kDa) (Oppenheimer L., et al. 1979).

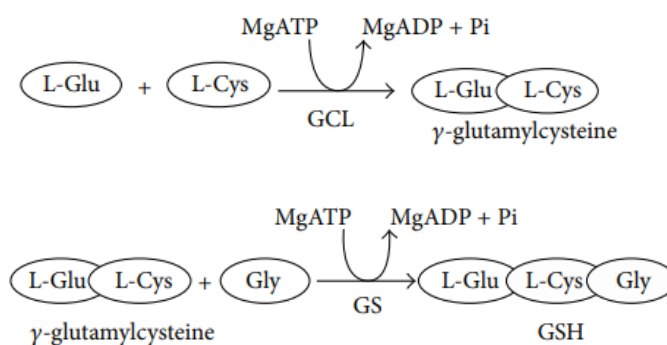


Figura 8. La sintesi del GSH (Traverso N., et al. 2013).

Un'altra importante funzione del GSH è rappresentata dall'azione detossificante che consiste nella formazione di coniugati del GSH con xenobiotici o loro metaboliti che può avvenire in maniera spontanea o per via enzimatica mediante la GSH-S-transferasi (Meister A., 1995; Sies H., 1999). I coniugati, una volta formati sono usualmente escreti dalle cellule, andando incontro al clivaggio mediato dalla GGT, che rilascia cisteinil-glicina, la quale è successivamente clivata da una dipeptidasi, con formazione di un cisteinil-coniugato, a cui fa seguito una N-acetilazione, con produzione di acido mercapturico (Franco R., et al. 2007).

Molto importante è l'azione antiossidante del GSH (Fig. 10) che elimina direttamente anione superossido, radicale ossidrilico, radicali carboniosi, idroperossidi, perossinitriti e perossidi lipidici (Mari M., et al. 2009). Indirettamente il GSH svolge funzione antiossidante provvedendo alla rigenerazione delle vitamine C ed E.

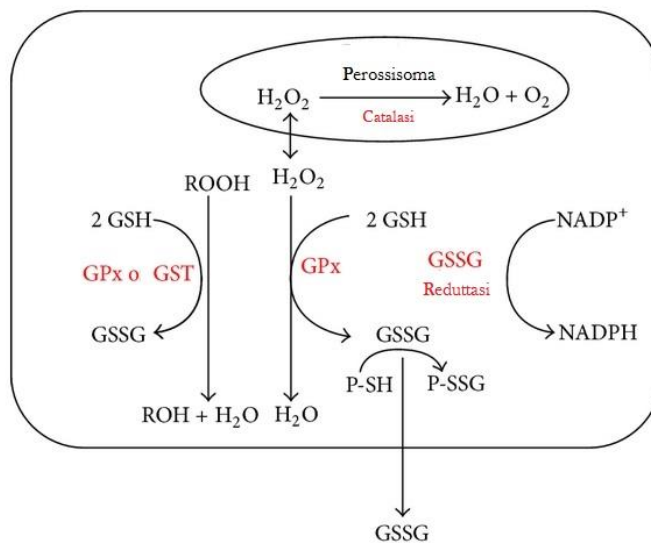


Figura 10. Funzione antiossidante del GSH (Traverso N., et al. 2013).

Nell'ambito della fisiopatologia la modulazione dello stress ossidativo (Fig. 10) è stata dimostrata essere un fattore importante nello sviluppo del cancro e nella risposta delle cellule tumorali alla terapia (Gorrini C., et al. 2013).

Tra gli antiossidanti, il GSH, avendo un ruolo essenziale nel mantenere un corretto equilibrio redox, può proteggere le cellule tumorali dallo stress ossidativo basale e da quello indotto dai trattamenti (Traverso N., et al. 2013). Infatti, è stato dimostrato che composti antagonisti del GSH o inibitori della sua sintesi combinati con la radio o chemioterapia possono essere utilizzati per aumentare la suscettibilità delle cellule cancerose ai trattamenti convenzionali.

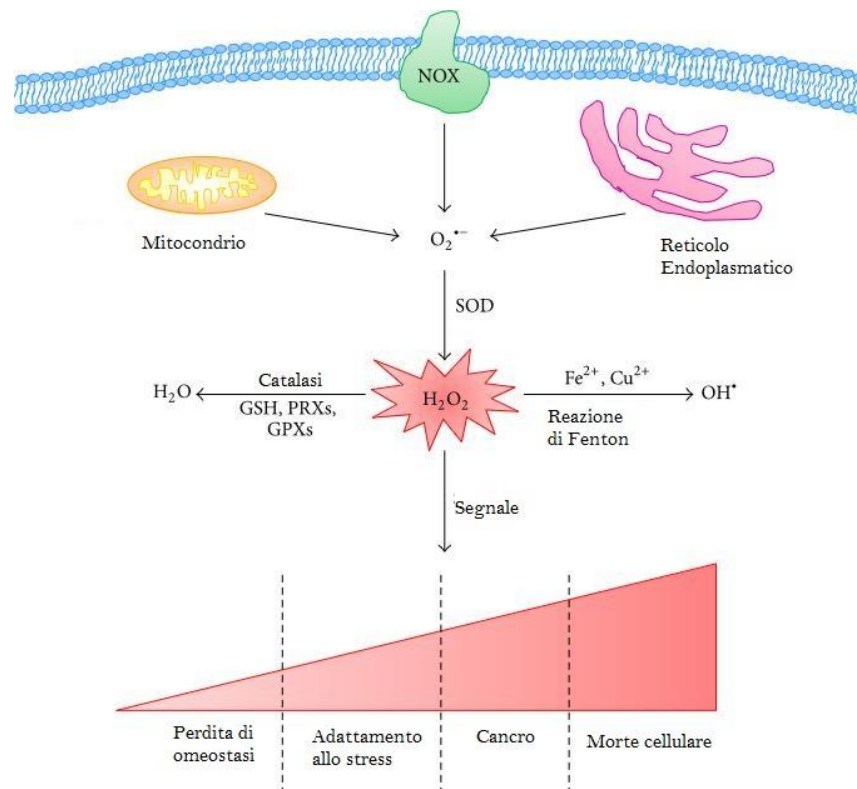


Figura 11. L'omeostasi redox è un equilibrio della produzione e della eliminazione dei ROS. I mitocondri, la NADPH ossidasi (NOX) e il reticolo endoplasmatico sono le tre principali fonti intracellulari di ROS. La quantità di H_2O_2 è decisiva per il destino cellulare: livelli bassi e intermedi del perossido di idrogeno stimolano la perdita di omeostasi cellulare ed un maggiore adattamento allo stress che porta alla trasformazione neoplastica mentre alti livelli inducono morte cellulare (Marengo B., et al. 2016).

Livelli elevati di GSH sono stati osservati in vari tipi di neoplasie e questo li rende più resistenti alla chemioterapia (Calvert P., et al. 1998; Estrela J.M.,

et al. 2006). A questo riguardo, nell'epatocarcinoma (Huang Z.Z., et al. 2001) e nel melanoma metastatico (Carretero J., et al. 1999) il contenuto di GSH è correlato con la crescita tumorale ed è stato anche dimostrato che esiste una correlazione diretta tra i livelli di GSH, la proliferazione e l'attività metastatica cellulare (Marengo B., et al. 2010). Inoltre, la quantità di GSH in alcune cellule tumorali è stata associata a livelli più alti di enzimi correlati al GSH, come le attività della GCL e della GGT, nonché ad una alterata espressione di pompe di membrana deputate all'efflusso di GSH (Estrela J.M., et al. 2006; O'Brien M.L., et al. 1996).

Considerato il ruolo del GSH nella sopravvivenza del tumore, il tripeptide è tutt'oggi studiato come possibile bersaglio per l'intervento medico contro la progressione neoplastica e la resistenza ai farmaci.

La ricerca in questo campo si è focalizzata a depletare la cellula cancerosa di GSH mediante una specifica inibizione della GCL, un enzima chiave della biosintesi del GSH. In questo contesto, la butionina sulfossimina (BSO) è l'agente depletante più studiato in studi clinici e preclinici (Griffith O.W., 1982; O'Dwyer P.J., et al. 1996). Infatti, la BSO, inibitore irreversibile della GCL, è stata associata a molti agenti chemioterapici (Reber U., et al. 1998; Anderson C.P., et al. 1999; D'Alessio M., et al. 2004). Purtroppo, l'uso clinico della BSO è limitato dalla sua breve emivita, che richiede pertanto infusioni prolungate con un conseguente effetto depletante non selettivo sia sulle cellule normali che su quelle neoplastiche (Hamilton D., et al. 2007). Inoltre, poiché sono stati identificati livelli abbondanti di GST (Batist G., et al. 1986; Colla R., et al. 2016) nei tumori resistenti, sono stati sviluppati analoghi del GSH che inibiscono in modo differenziale le isoforme GST. Inoltre, l'implicazione dell'attività GGT nel fenotipo resistente delle cellule tumorali suggerisce un potenziale uso di inibitori della GGT associati a chemioterapici al fine di esaurire il GSH intracellulare e/o di inibirne l'attività detossificante. Sono noti diversi inibitori della GGT (Tate S.S., et al. 1978; London R.E., et al. 2001; Han L., et al. 2007), ma sfortunatamente queste molecole sono tossiche e non possono essere utilizzate nella pratica clinica (Zhang Y., et al. 1992).

Quindi, la modulazione del GSH cellulare potrebbe rivelarsi un'arma a doppio taglio (Lushchak V.I., 2012): da una parte il mantenimento dei livelli di GSH può proteggere le cellule dal danno indotto dai cancerogeni ambientali e dall'altro l'approccio finalizzato ad esaurire le scorte cellulari di GSH può sensibilizzare le cellule tumorali alla chemioterapia convenzionale (Cowan K.H., et al. 1986).

3.5.1 GSH e CSC: ruolo di xCT e CD44

Il sistema xc(-) è composto da una catena leggera (xCT o SLC11) e da una catena pesante (CD98hc o SLC3A2) e funziona come un trasportatore antiporto che media la fuoriuscita di glutammato e l'ingresso della cistina, essenziale per la sintesi intracellulare di GSH (Lo M., et al. 2008) (Fig. 12).

La trascrizione del messaggero di xCT è indotta dallo stress ossidativo o dalla deplezione di cistina e tale effetto è regolato dal legame del fattore di trascrizione Nfr2 al promotore di xCT (Sasaki H., et al. 2002). Recentemente, è stato riportato che cellule con deficienza di xCT o bassi livelli di GSH mostravano attivazione di p38MAPK anche a bassi livelli di ROS (Chen R.S., et al. 2009; Sato H., et al. 2005).

Inoltre, xCT è implicato nella proliferazione e nella resistenza multifarmaco di diverse tipologie di cellule tumorali (Chen R.S., et al. 2009; Huang Y., et al. 2005).

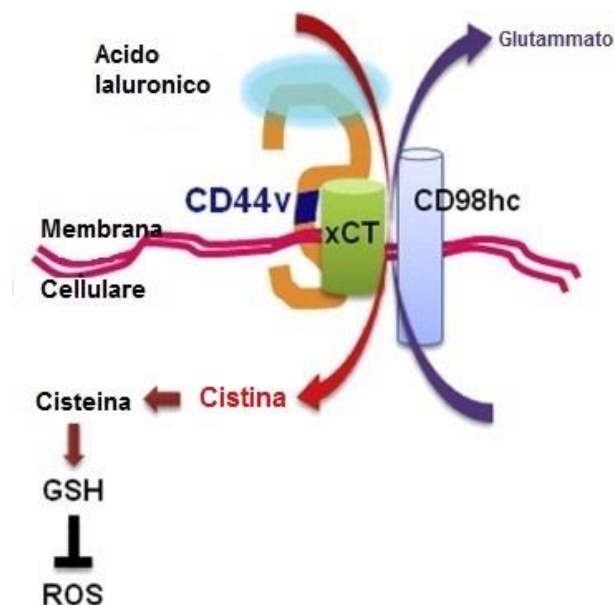


Figura 12. Il sistema xc(-) è posizionato sulla membrana cellulare ed è una proteina antiporto: trasporta all'interno della cellula la cistina, da cui si ottiene la cisteina ed il GSH, ed all'esterno il glutammato (Ishimoto T., et al. 2011).

Come riportato dalla Fig. 12, la proteina xCT viene stabilizzata in membrana da CD44, un marcatore di staminalità espresso sulla superficie delle CSC di tumori solidi inclusi carcinomi mammari, del colon, del pancreas e della prostata (Al-Hajj M., et al. 2003; Collins A.T., et al. 2005; Yan Y., et al. 2015; Ishimoto T., et al. 2011).

CD44 è una proteina transmembrana con funzioni di adesione per l'acido ialuronico, uno dei principali componenti della matrice extracellulare (Ponta H., et al. 2003) ed esiste in numerose isoforme che sono generate da *splicing* alternativi del messaggero precursore di CD44 (Ponta H., et al. 2003). Il gene codificante il CD44 contiene 20 esoni, 12 dei quali sono espressi dalla forma più comune di CD44, denominata CD44 standard (CD44s) che in genere è espressa nelle cellule ematopoietiche e nelle cellule epiteliali. Gli esoni non varianti codificano per un dominio extracellulare, un dominio transmembrana ed un dominio intracellulare. Le isoforme varianti di CD44 (CD44v-) sono generate dall'inserzione di esoni alternativi (V1-V11) in un

singolo sito posto all'interno della porzione membrana-prossimale del dominio extracellulare.

Le modifiche post-trascrizionali, inclusa la glicosilazione e l'attaccamento dei glicosaminoglicani, generano un'ulteriore diversità strutturale di CD44. Le alterazioni dell'espressione e della struttura del CD44 sono state documentate in molti tipi di cancro e sono correlate alla capacità metastatica del tumore (Naor D., et al. 1997; Ponta H., et al. 2003). E' stato dimostrato che la variante CD44v9 interagisce con xCT regolando la sintesi di GSH (Fig. 12). Le cellule di carcinoma gastrico con un alto livello di espressione di CD44 mostravano una maggiore capacità di sintesi del GSH e quindi una maggiore difesa contro le ROS (Ishimoto T., et al. 2011).

Comunque, le isoforme CD44v8-10 sono state identificate come marcatori di superficie cellulare per le CSC (Ishimoto T., et al. 2011; Lau W.M., et al. 2014) e sono abbondantemente espresse nei carcinomi di tipo epiteliale (Tanabe K.K., et al. 1993) anche se il loro ruolo funzionale non è chiaro. È stato recentemente riportato che le CSC del tumore al colon retto esprimono CD44v e tale espressione è associata all'attivazione del recettore c-MET, comunemente attivato dall' HGF (*hepatocyte growth factor*) (Ohata H., et al. 2012).

CD44v9, xCT e Proteina chinasi Ca

E' stato riportato che la protein chinasi Ca ($\text{PKC}\alpha$) è responsabile dell'attivazione della metalloproteasi 9, la quale taglia il dominio extracellulare solubile di CD44, attivando così una γ secretasi responsabile del taglio del dominio intracellulare di CD44, il quale trasloca nel nucleo stimolando l'espressione del gene codificante per CD44 stesso (Nagano O., et al. 2004), ed in particolare la variante CD44v9, che attiva xCT. Quindi, inibendo la $\text{PKC}\alpha$, verrebbe ostacolata l'attivazione di xCT, con una diminuzione significativa di GSH.

La $\text{PKC}\alpha$ è una serina/treonina chinasi appartenente alla famiglia di PKC classiche o convenzionali (cPKC, Fig. 13) che sono dipendenti dal calcio e attivate dalla fosfatidilserina. Questa isoforma è ubiquitariamente espressa

ed è attivata in risposta a diversi tipi di stimoli e trasloca dal citosol verso compartimenti cellulari specializzati (nucleo, caveole ecc) dove va a svolgere le sue funzioni. La PKC α è stata implicata in una varietà di funzioni cellulari che includono proliferazione, apoptosi, differenziazione, motilità ed infiammazione.

La PKC α dei mammiferi consiste di 672 aminoacidi ed è distribuita in tutti i tessuti, a differenza delle altre isoforme di PKC la cui espressione è tessuto-specifica (Nishizuka Y., 1992; Dempsey E.C., et al. 2000). L'aumento del diacilglicerolo (DAG) e del calcio agiscono sinergicamente nella cellula stimolata determinando il rilascio di uno pseudo-substrato dalla regione del sito attivo e portando quindi all'attivazione della proteina chinasi C α (Dutil E.M., et al. 2000). L'attività chinastica della PKC α è regolata dalla fosforilazione di tre residui conservati nel suo dominio chinastico: l'attivazione della Treonina 497, l'autofosforilazione della Treonina 638 e della Serina 657 (Bornancin F., et al. 1999). La fosforilazione della Serina 657 è spesso utilizzata come *marker* di attivazione della PKC α (Bornancin F., et al. 1999).

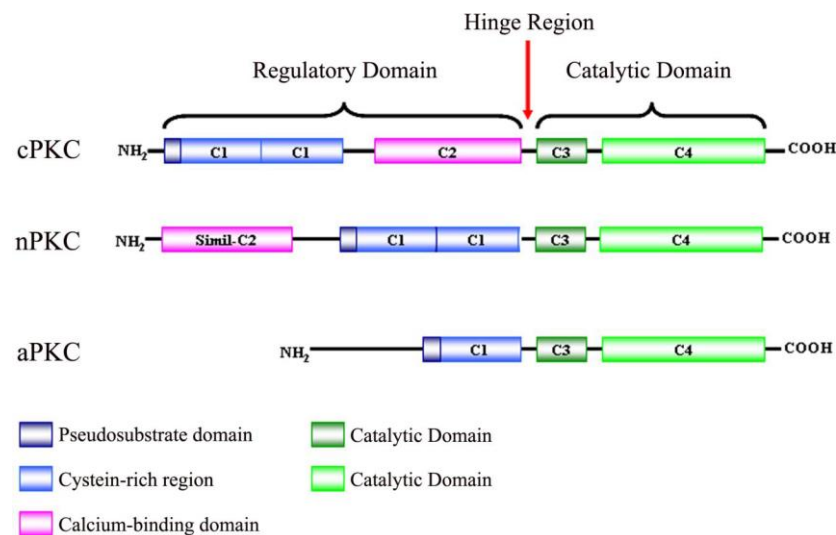


Figura 13. Isoforme della PKC (Marengo B., et al. Cancers 2010).

In seguito a stimolazione, la PKC α trasloca dal citosol in membrana: questa traslocazione fu identificata per la prima volta tramite *western blot* condotto

dopo frazionamento subcellulare utilizzando un anticorpo specifico anti-PKC α e successivamente confermato da uno studio di immunofluorescenza. Esempi di compartimenti membranali a cui la PKC α trasloca sono: il nucleo, le adesioni focali e le regioni di contatto cellula-cellula (Vallentin A., et al. 2000). Traslocando, la PKC α si attiva e fosforila substrati che variano a seconda del tipo cellulare e dello stimolo. La PKC α è implicata nella crescita e nel differenziamento cellulare e nel controllo del ciclo cellulare. Per quanto riguarda la proliferazione e l'apoptosi, questi processi sono inversamente regolati dalla PKC α e dalla PKC δ , membro della famiglia delle PKC nuove (Romanova I.Y., et al. 1998; Mandil R., et al. 2001). Una *overexpression* di PKC α promuove la proliferazione in alcuni modelli cellulari (Ways D.K., et al. 1995) ma causa l'arresto del ciclo cellulare e del differenziamento in altri tipi di cellule. Infatti, le risposte sono modulate da interazioni dinamiche della chinasi con substrati, modulatori e proteine di ancoraggio.

L'effetto pro-proliferativo della PKC α sembra essere mediato dall'attivazione della cascata extracellulare chinasi mitogenica attivata dalle proteine chinasi ERK/MAPK iniziata da Raf-1 (Kocch W., et al. 1993) e/o dalla *upregulation* di p21 (Besson A., et al. 2000), che facilita la formazione del complesso tra la ciclina e la chinasi ciclina dipendente (CDK). Al contrario, in altri tipi cellulari l'overespressione di PKC α porta all'arresto del ciclo cellulare ed all'inibizione della crescita. E' stato osservato che nella linea di cellule della cripta intestinale IEC-18 (Frey M.R., et al. 2000), l'attivazione della PKC α sembra mediare l'arresto del ciclo cellulare causato da un accumulo della forma ipofosforilata della proteina del retinoblastoma e dall'induzione degli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti.

Anche il ruolo della PKC α nell'apoptosi dipende dalla tipologia cellulare: in generale, la PKC α ha una funzione antiapoptotica e potrebbe agire come un fattore di sopravvivenza (Dempsey E.C., et al. 2000). A prova di questo, l'induzione dell'apoptosi è spesso accompagnata dall'inibizione della PKC α come è stato osservato nelle cellule di glioblastoma (Neuzil J., et al. 2001; Shen L., et al. 1999). Infatti, la *downregulation* della PKC α tramite lo

specifico oligonucleotide antisense determinava induzione di p53 e di proteine pro-apoptotiche p53-dipendenti come Bax, Apaf-1 e caspasi. Quindi, da questa evidenza, sembra che la PKC α svolga un'azione anti-apoptotica mediante il blocco dell'induzione di p53. Comunque, l'azione anti-apoptotica della PKC α sembra anche essere mediata dall'attivazione della cascata Raf-1/ERK/MAPK (Kocch W., et al. 1993; Schönwasser D.C., et al. 1998) e/o dalla fosforilazione della proteina anti-apoptotica Bcl2 (Ruvolo P.P., et al. 1998).

E' stato riportato che nelle cellule progenitrici ematopoietiche, la PKC α è strettamente coinvolta nel differenziamento a macrofagi (Pierce A., et al. 1998). Inoltre, la PKC α è coinvolta nella regolazione della motilità cellulare e nell'adesione cellula-cellula.

Considerato il suo ruolo pro-proliferativo ed anti-apoptotico, l'overespressione della PKC α è implicata nel determinare fenotipi maligni aggressivi e metastatici nel glioma e nel cancro mammario (Sun X., et al. 1999; Ways D.K., et al. 1995). E' stato anche osservato che il silenziamento di PKC α era in grado di modificare il fenotipo trasformato delle cellule di tumore al polmone (Wang X.Y., et al. 1999) e delle cellule di glioma (Dean N., et al. 1996). Inoltre, la PKC α può anche essere coinvolta nella resistenza ai farmaci mediante fosforilazione ed attivazione delle pompe di efflusso di membrana, tra cui la glicoproteina P (Ways D.K., et al. 1995). La PKC α ha anche un possibile ruolo nella risposta infiammatoria ed in particolare stimola la produzione di ossido nitrico (NO), un mediatore infiammatorio prodotto dai macrofagi attivati (Li S., et al. 1998). In contrasto con queste evidenze, la PKC α sembra inibire la risposta secretoria ed il rilascio dei metaboliti dell'acido arachidonico nei mastociti della linea cellulare RBL-2H3 (Ozawa K., et al. 1993).

3.6 Inibizione della PKC α nella terapia anticancro

Il coinvolgimento delle PKC nel cancro supporta l'idea che le PKC possano essere dei diretti potenziali *target* per la terapia antitumorale; infatti, molti modulatori delle PKC sono utilizzati in *trials* clinici da soli o in

combinazione con altri composti. I farmaci inibitori delle PKC includono inibitori del dominio che lega l'ATP, piccole molecole che inibiscono le chinasi, modulatori biologici delle PKC e oligonucleotidi anti-senso (Marengo B., et al. 2011 a). Tra questi troviamo la Staurosporina, la Midostaurina, la Enzastaurina, l'UCN-01 (7-idrossistaurosporina) la Briostatina, l'Ingenolo-3-angelate (PEP-005), l'Aprinocarsen (ISIS 3521), gli analoghi dei nucleosidi (ARC, sangivamycina), la perisofina octadecil-(1,1-dimetil-4-piperidilio) fosfato e il Disulfuram (Way K.J., et al. 2000).

L'*Aprinocarsen* è un oligonucleotide antisenso che riduce selettivamente i livelli di PKC α nelle linee cellulari umane e ne inibisce l'espressione nelle cellule tumorali di glioblastoma umano. Nei pazienti con glioblastoma e astrocitoma ad alto grado di malignità non dava benefici ed il rapido decadere dell'effetto potrebbe essere dovuto ad una rapida crescita tumorale (Grossman S.A., et al. 2005).

L'inibitore antisenso in combinazione con gemcitabina e carboplatino è stato usato in uno studio di Fase 2 condotto in pazienti con tumore polmonare, ma solo il 25 % di essi ha avuto una risposta parziale ai trattamenti in quanto tale approccio ha mostrato tossicità associata con trombocitopenia e neutropenia (Ritch P., et al. 2006).

Il farmaco è stato testato in pazienti con carcinoma ovarico avanzato, ed è stato osservato che esso, quando era somministrato da solo, non aveva attività clinica significativa (Advani R., et al. 2004).

In pazienti con cancro avanzato si è osservato che l'Aprinocarsen causava nausea, vomito, febbre, brividi e stanchezza da lieve a moderata e trombocitopenia (Nemunaitis J., et al. 1999).

Inoltre, in studi di Fase 1 è stata determinata la massima dose tollerabile (MTD) in pazienti con cancro avanzato. Tale ricerca ha dimostrato che l'Aprinocarsen causava effetti concentrazione-dipendenti sulla attivazione della coagulazione e del complemento, (Advani R., et al. 2005).

3.7 Sulfasalazina: un inibitore di xCT

La sulfasalazina (SSZ) è un farmaco appartenente alla famiglia dei sulfamidici. Questi composti sono caratterizzati dall'essere farmaci antimicrobici ottenuti per sintesi chimica e non da microorganismi come i veri e propri antibiotici. Essi sono stati sintetizzati verso la metà degli anni 30, oggi la loro diffusione è enormemente diminuita e sono tuttora considerati farmaci minori in confronto ad altri antibiotici. Il loro meccanismo d'azione consiste nell'inibire l'enzima diidropteroato-sintetasi, necessario per la biosintesi dei derivati dell'acido folico, quindi del DNA, agendo per competizione con l'acido para-aminobenzoico, un componente strutturale fisiologico presente nel sito attivo dell'enzima. Questi farmaci presentano una tossicità selettiva dovuta al fatto che l'uomo non è in grado di sintetizzare i folati a partire dai loro componenti perché non possiede gli enzimi necessari, inclusa la diidropteroato-sintetasi ed infatti, per la nostra specie l'acido folico deve essere presente nella dieta. La SSZ è un profarmaco poiché è intrinsecamente attivo a causa dell'assenza di un gruppo aromatico para-ammino sostituito; i batteri intestinali convertono il profarmaco in solfapiridina e acido 5-amminosalicilico, il vero e proprio antinfiammatorio (Fig. 14). Per questo motivo è stato utilizzato in passato nella terapia della colite ulcerosa e nel morbo di Crohn (Binder V., et al. 1972).

La SSZ interagisce con i domini lipofilici del canale xCT (Sontheimer H., et al. 2012) ed è stato osservato che, per inibire xCT, tale composto deve essere integro. Studi di biodisponibilità hanno dimostrato che solo il 12% del farmaco somministrato oralmente riesce a sfuggire al clivaggio mediato dalle colonie intestinali, entrando in circolo a livello sistemico (Sontheimer H., et al. 2012). La sua emivita negli umani è di 10.2 ore (Azadkhan A.K., et al. 1982) e poi viene trasformata in acido 5-amminosalicilico. Di qui nasce l'esigenza di sviluppare inibitori di xCT più specifici e potenti con una maggiore biodisponibilità (Sontheimer H., et al. 2012).

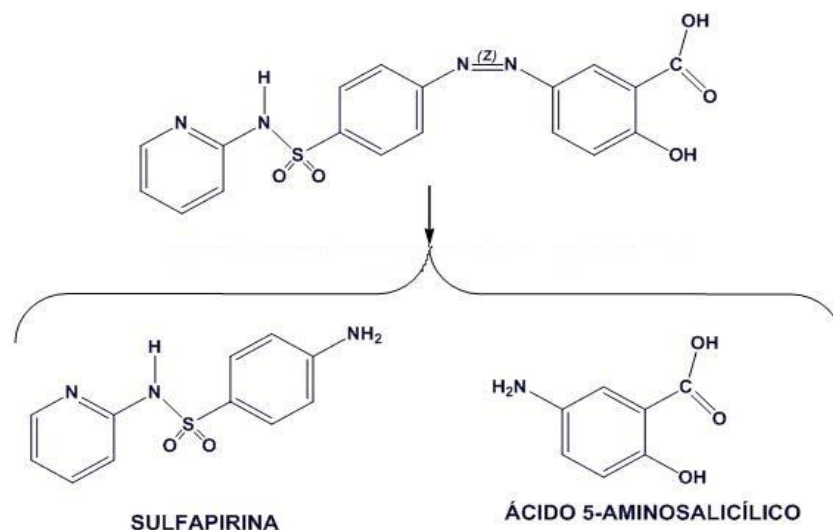


Figura 14. Attivazione della sulfasalazina ad acido para-amminosalicilico (PAS).

La SSZ, inibendo il trasportatore xCT, reprime la crescita tumorale CD44v-dipendente, aumentando *in vivo* la sensibilità ai farmaci citotossici. In base a queste evidenze, la SSZ potrebbe rappresentare un nuovo agente terapeutico contro le CSC.

Inoltre, è stato osservato che nelle neoplasie cerebrali la SSZ agisce come sensibilizzante al carboplatino. In particolare, dati preclinici ottenuti nei gliomi, forme tumorali in cui xCT è altamente espresso (Sato H., et al. 1999), mostrano che la SSZ è efficace nell'inibire la crescita tumorale e le complicazioni ad essa associate (Sontheimer H., et al. 2012; Chung W.J., et al. 2009). Infatti, le convulsioni sono una comune comorbidità nei pazienti con tumore al cervello e sono sempre state attribuite all'irritazione o alla compressione del tessuto cerebrale da parte del tumore in crescita. Più recentemente, si è sviluppata la convinzione che l'epilessia nei pazienti con tumori cerebrali primari non sia causata solo dalla crescita della neoplasia, ma anche dal rilascio, attraverso xCT, di glutammato che successivamente attiva i recettori del glutammato della zona peritumorale. Inoltre, è stato recentemente osservato nella terapia del cancro al colon retto, che l'inibizione di xCT, ottenuta con SSZ associata al cisplatino ha un effetto citotossico sinergico (Ma M.Z., et al. 2015).

Inoltre, è stato dimostrato che *in vitro* livelli terapeutici di SSZ inibivano la replicazione delle cellule di linfoma ed *in vivo* portavano alla riduzione della crescita del linfoma trapiantato in topi senza causare effetti tossici (Gout P.W., et al. 2001).

In cellule di tumore polmonare xCT è altamente espresso e l'inibizione con SSZ ha dimostrato causare un decremento della proliferazione cellulare ed una riduzione dell'invasività sia *in vitro* che *in vivo* (Ji X., et al. 2018; Guan J., et al. 2009).

In uno studio di Fase 1 che prevedeva la somministrazione di SSZ e cisplatino in pazienti con tumore gastrico resistente al cisplatino è stata osservata una riduzione delle cellule CD44 positive ed un calo di GSH intracellulare. La SSZ era stata somministrata oralmente quattro volte al giorno per due settimane con una settimana di riposo mentre il cisplatino era somministrato ogni 3 settimane. In seguito al trattamento, il 72% dei pazienti andava incontro ad una riduzione di positività di CD44 nelle biopsie tumorali prelevate dopo 14 giorni di somministrazione di SSZ (Shitara K., et al. 2017 b), ma solo il 6% andava incontro ad una stabilizzazione della malattia e ad una la riduzione di GSH intracellulare (Shitara K., et al. 2017 a).

4. L'IMPORTANTE RUOLO DELLA MODULAZIONE DELL'EQUILIBRIO REDOX NELLA TERAPIA ANTITUMORALE

Molteplici studi concordano nel dimostrare che, rispetto alle loro controparti normali, le cellule tumorali, in conseguenza di un'alterazione dell'omeostasi redox, presentano elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Szatrowski T.P., et al. 1991; Kawanishi S., et al. 2006; Toyokuni S., et al. 1995). Tra i principali fattori coinvolti in tale processo, vi sono oncogeni attivati, alterazioni del metabolismo e disfunzioni mitocondriali (Irani K., et al. 1997; Rodrigues M.S., et al. 2008; Brandon M., et al. 2006).

Le terapie pro-ossidanti, radiazioni ionizzanti ed agenti chemioterapici vengono ampiamente utilizzate in clinica perché, aggiungendo un ulteriore danno ossidativo alla condizione di stress ossidativo presente basalmente nelle cellule tumorali, sono capaci di causare il collasso dei sistemi antiossidanti, inducendo morte cellulare (Lecane P.S., et al. 2005).

Tuttavia, questo approccio non sempre si è rivelato soddisfacente perché molti tumori primari si adattano alla terapia pro-ossidante overesprimendo gli antiossidanti cellulari ed inducendo uno stato di resistenza.

A tale riguardo, è stato dimostrato che la maggiore espressione di molecole antiossidanti come il glutathione (GSH) e/o alterazioni del metabolismo ossidativo cellulare sono tra i meccanismi maggiormente responsabili di tale adattamento redox (Pervaiz S., et al. 2004; Sullivan R., et al. 2008; Trachootham D., et al. 2008 a; Schneider B.L., et al. 2004; Chen E.I., et al. 2007).

Quindi, al fine di raggiungere la selettività terapeutica e superare la resistenza ai farmaci associata all'adattamento redox, è importante progettare una strategia che sfrutti la differenza redox tra cellule normali e cellule cancerose e che "disabiliti" in queste ultime il meccanismo di adattamento. Una terapia efficace potrebbe essere quella che ha come bersaglio i meccanismi regolatori redox che controllano sia i livelli di ROS che la funzione delle proteine redox-sensibili.

In tale contesto, molteplici studi hanno dimostrato l'efficacia di tale approccio (Trachootham D., et al. 2006; Trachootham D., et al. 2008 b; Zhang H., et al. 2008) e studi da noi condotti su cellule di neuroblastoma (NB) umano hanno ampiamente dimostrato come l'impiego di L-butionina-sulfossimina (BSO), un'agente depletante il GSH, è efficace nell'indurre apoptosi (Domenicotti C., et al. 2003; Marengo B., et al. 2005; Marengo B., et al. 2008) e nel sensibilizzare le cellule tumorali all'azione dell'Etoposide, un chemioterapico ampiamente utilizzato in clinica che esplica la sua azione tossica incrementando la produzione di ROS (Marengo B., et al. 2011). Inoltre, ricerche da noi condotte più recentemente hanno dimostrato che l'acquisizione della resistenza all'Etoposide e alla doxorubicina, un altro chemioterapico con azione pro-ossidante, è dovuta alla presenza di elevati livelli di GSH nelle cellule tumorali resistenti ed anche alla capacità di tali cellule di mantenere un'efficiente metabolismo ossidativo (Colla R., et al. 2016) . Al contrario, le cellule sensibili al trattamento vanno incontro ad una riduzione dei livelli di GSH e ad uno *switch* metabolico a favore della glicolisi anaerobia (Colla R., et al. 2016).

È stato dimostrato che all'interno del tumore che recidiva e che si abitua a crescere in condizioni ipossiche vi è una sotto-popolazione di cellule staminali del cancro (CSC) (Zhao J., 2016) che sostiene la crescita del cancro ed è responsabile della resistenza ai farmaci.

Tale sottopopolazione è dotata di grande eterogeneità e presenta caratteristiche biologiche analoghe a quelle delle normali cellule staminali ossia capacità di auto-rinnovarsi, di mantenere uno stato multipotente e di avere, rispetto alle cellule differenziate, un metabolismo più lento che consente loro di risentire, in maniera minore, dei danni indotti dalla produzione di ROS.

Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che le CSC sono dotate di un'elevata capacità antiossidante che consente loro di mantenere bassi livelli di ROS e di sostenere la staminalità. I bassi livelli di ROS presenti nelle CSC sono il risultato di una combinazione di meccanismi specifici che includono l'*up-regulation* degli scavenger dei ROS, la *down-regulation* degli enzimi

coinvolti nella produzione di ROS, un metabolismo glicolitico predominante con riduzione del consumo di ossigeno, e la capacità di sintetizzare elevate quantità di GSH mediante *overexpression* di xCT, un trasportatore di cistina presente sulla membrana cellulare (Diehn M., et al. 2009; Ye X.Q., et al. 2011; Ishimoto T., et al. 2011).

A tale riguardo, è stato dimostrato che la BSO, inducendo un incremento della produzione di ROS è in grado di ridurre il potenziale clonogenico delle CSC sensibilizzandole alla radioterapia (Diehn M., et al. 2009). Pertanto, il GSH, e in particolare il mantenimento della sua elevata quantità intracellulare, può avere un ruolo cruciale nella sopravvivenza e resistenza delle CSC ai trattamenti antitumorali. Inoltre, è stato ampiamente riportato che le CSC hanno comunque, a differenza delle cellule tumorali non staminali, un efficiente metabolismo ossidativo che è implicato nell'acquisizione della chemioresistenza e, a sua volta, la chemioterapia può influenzare il metabolismo delle CSC (Vander Heiden M.G., et al. 2009; Rossi D.J., et al. 2008; Huang S.C., et al. 2014).

5. SCOPO DELLA RICERCA

Considerando l'insieme di queste evidenze, la ricerca antitumorale dovrebbe focalizzarsi sullo sviluppo di approcci in grado di aumentare i livelli di ROS nelle CSC inibendo le risposte antiossidanti e alterando il metabolismo cellulare, prevenendo in tale modo la chemioresistenza. Ad oggi, nonostante siano stati condotti numerosi studi in tale ambito, i meccanismi alla base della regolazione redox nelle CSC e il loro coinvolgimento nella resistenza terapeutica non sono stati ancora pienamente compresi.

Sulla base di tali premesse, riteniamo che il chiarire i meccanismi molecolari che determinano l'omeostasi redox e che regolano l'adattamento metabolico a cui vanno incontro le CSC possa essere cruciale nell'identificare i mediatori chiave capaci di rendere tale popolazione cellulare refrattaria alla chemioterapia. Pertanto, gli obbiettivi che tale tesi di Dottorato si è prefissata sono stati tre: 1) isolare una popolazione di cellule tumorali con caratteristiche di staminalità a partire dalle HTLA-230 (linea cellulare di NB umano, MYCN amplificata, derivante da un paziente allo stadio IV) e HTLA-ER (Etoposide resistenti), derivanti dalle HTLA trattate cronicamente per sei mesi con la dose 1.25 μ M di Etoposide; 2) indagare il ruolo del GSH e del metabolismo ossidativo nella formazione e nel mantenimento delle CSC derivanti dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER dopo trattamento acuto con Etoposide e 3) aumentare la suscettibilità delle CSC chemioresistenti associando al trattamento con Etoposide due composti capaci di abbassare i livelli di GSH attraverso un'azione diretta o indiretta su xCT. A questo riguardo occorre ricordare che la Sulfasalazina, inibisce direttamente xCT mentre il C 2-4, inibendo la PKC α , reprime l'espressione di CD44 v9 e quindi xCT.

6. MATERIALI E METODI

6.1 Sostanze chimiche

L'Etoposide è stata acquistata dalla Calbiochem (Merk KGaA, Darmstadt, Germania) mentre la sulfasalazina (SSZ), inibitore di xCT, e l'inibitore peptidico della PKC α (C2-4) dalla Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, Stati Uniti). Le soluzioni madre di tali composti sono state preparate utilizzando come solvente il dimetilsolfossido (DMSO).

6.2 Allestimento e mantenimento delle *Cancer Stem Cells* (CSC)

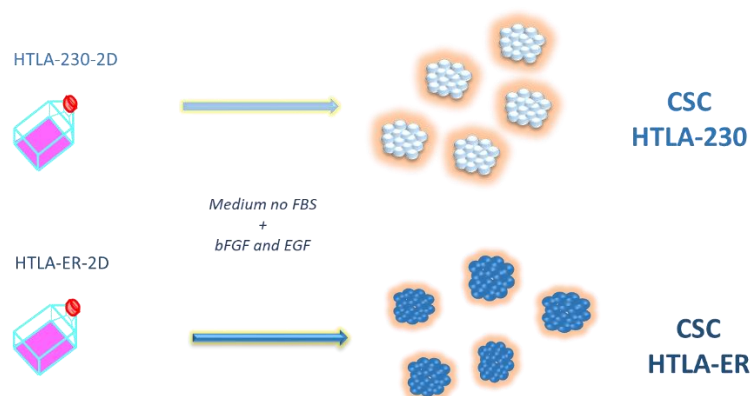
Al fine di studiare il ruolo del glutatione nella resistenza delle CSC all'Etoposide si è utilizzato quale modello sperimentale la linea cellulare HTLA-230, una linea di neuroblastoma umano allo stadio IV con amplificazione dell'oncogene MYCN, gentilmente fornite dalla Dott.ssa Raffaghello dell'Istituto G. Gaslini (Genova, Italia).

Dalle cellule HTLA-230 trattate per sei mesi con dosi crescenti di Etoposide (1nM-1.25 μ M) è stata selezionata una popolazione cellulare resistente al chemioterapico (HTLA-ER) che è stata mantenuta in coltura con Etoposide 1.25 μ M (Colla R., et al. 2016), dose paragonabile, *in vitro*, alla concentrazione massima utilizzata in clinica (Karlsson J., et al. 2004). Tutte le linee cellulari sono state testate periodicamente con PCR semiquantitativa per la valutazione di eventuali contaminazioni da micoplasma (Mycoplasma Reagent Set; Euroclone s.p.a., Pavia, Italy). Le cellule parentali HTLA-230 e le HTLA-ER sono state mantenute in coltura in terreno RPMI 1640 (Euroclone) contenente siero fetale bovino 10% (FBS; Euroclone), glutammina 2 mM (Euroclone), penicillina/streptomicina 1% (Euroclone), sodio piruvato 1% e soluzione di amminoacidi 2% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

Per la selezione delle CSC, le cellule HTLA-230 e HTLA-ER capaci di crescere in sospensione sono state raccolte, centrifugate (800 rpm x 8 min., 8°C; Eppendorf 5810 R), seminate (16×10^4) e fatte crescere in terreno di coltura DMEM-F12 Knock-out (Life Technologies) contenente

penicillina/streptomicina 1% (Euroclone), B27 2% (Life Technologies), fattore di crescita basale per i fibroblasti (bFGF) 40 ng/ml (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN USA) e fattore di crescita epidermico (EGF) 20 ng/ml (Life Technologies) (Toma J.G., et al. 2005). Le CSC ottenute sotto forma di sferoidi o neurosfere sono state divise (*split*) una volta alla settimana per favorirne l'espansione e ad ogni passaggio il terreno di coltura era costituito da 50% di terreno fresco e 50% di terreno in cui le cellule erano cresciute (Fig. 15).

A)



B)

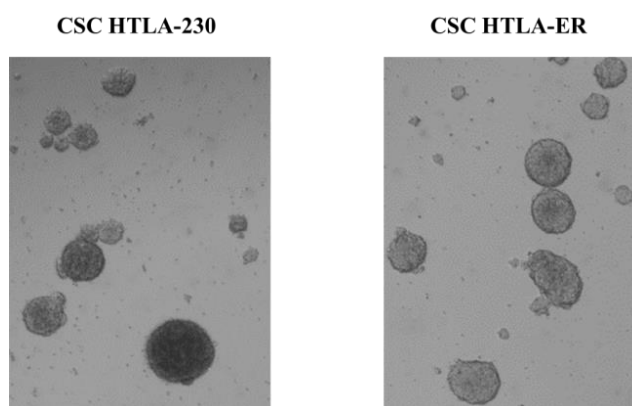


Figura 15. Selezione delle CSC. (A) Schema di selezione delle CSC originate dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER a partire dalle cellule adese (2D). (B) immagine rappresentativa delle CSC ottenuta mediante analisi al microscopio ottico utilizzando un ingrandimento 10 X.

6.3 Trattamenti

Le CSC ottenute dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER sono state trattate per tre volte alla settimana con C2-4 0.1 μ M, con SSZ 5 μ M o con Etoposide 1.25 μ M, somministrata una volta alla settimana da sola o in combinazione con il C2-4 o la SSZ. I trattamenti sono stati condotti per 6 settimane (Fig. 16). Le soluzioni *stock* di Etoposide, C2-4 e SSZ sono state preparate in DMSO alle rispettive concentrazioni di 50mM, 1mM e 50 mM e conservate a -20°C. Al momento dell'utilizzo, i composti sono stati diluiti in terreno di coltura per ottenere le concentrazioni finali. Considerato che i composti utilizzati erano disciolti in DMSO, sono stati condotti studi pilota che hanno dimostrato che tale solvente da solo, alle dosi impiegate per disciogliere i composti, non esercitava alcun effetto sulle diverse analisi effettuate.



Figura 16. Schema dei trattamenti. Rappresentazione schematica dei trattamenti settimanali a cui sono state sottoposte le CSC ottenute dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER. Tali trattamenti sono stati ripetuti per 6 settimane.

6.4 Immunofluorescenza e analisi citofluorimetrica

Per le analisi in citofluorimetria, le cellule HTLA-230, HTLA-ER e le CSC da esse derivate sono state raccolte e sedimentate mediante centrifugazione (800 rpm per 8 min. 8°C, Eppendorf 5810 R). Il sovranatante è stato eliminato ed il pellet cellulare è stato risospeso nella soluzione disagregante TrypLE™ Express Enzyme 1X (Invitrogen). Dopo aver monitorato al microscopio ottico l'avvenuta disagregazione delle CSC, è stato aggiunto PBS in proporzione 20:1 con la soluzione disagregante.

Al fine di analizzare l'espressione delle Oct3/4, CD44, CD44v9, xCT e vimentina (usata come controllo dell'avvenuta permeabilizzazione), le cellule sono state permeabilizzate e fissate per 30 min. a 4 °C con il kit BD Cytofix/Cytoperm™, BD Biosciences seguendo le indicazioni della

ditta produttrice. Dopo la permeabilizzazione/fissazione le cellule sono state risospese in una soluzione 1X di PBS/Saponina 1% (Sigma), centrifugate (1350 rpm per 10 min. a 4 °C) e quindi incubate per 30 min. a 4°C con gli anticorpi primari: monoclonale di *rat* anti-CD44v9 (Biolegend); policlonale di *rabbit* anti-CD44-ICD (BioLegend); anti-xCT (Santa Cruz Biotechnology); OCT3/4 (*Monoclonal Antibody* EM92, PE eBioscience. Al termine dell'incubazione con gli anticorpi primari le cellule sono state lavate con PBS/FBS 2% (Euroclone) e incubate per 30 min. a 4°C con i rispettivi anticorpi secondari, *Goat* anti-*rat*-IgG-FITC (Sigma), *Goat* anti-*rabbit*-IgG-PE (Southern Biotech), *Goat* anti-*mouse*-IgG-PE (Southern, Biotech). Successivamente, i campioni sono stati lavati con PBS/FBS 2%, e fissati in PBS/Formaldeide 1% e analizzati con il citofluorimetro FACScalibur (Becton Dickinson). I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software CellQuest (Becton Dickinson).

6.5 Analisi della propagazione delle CSC

Al fine di monitorare la capacità di propagazione delle CSCs le stesse sono state contate una volta a settimana ad ogni *split*. Al termine di ogni settimana di trattamento, le CSCs sono state raccolte, centrifugate (800 rpm per 8 min. a 8 °C; Eppendorf 5810 R), dissociate meccanicamente in 1 ml di PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.6 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM) e contate utilizzando una camera di Burkert (Marienfeld, Germania).

6.6 Analisi mediante HPLC dei livelli intracellulari di cisteina totale, glutatione ridotto (GSH) e glutatione ossidato (GSSG).

I livelli intracellulari di cisteina totale, glutatione ridotto (GSH) e glutatione ossidato (GSSG) sono stati valutati mediante cromatografia in fase liquida (HPLC) utilizzando i metodi riportati da Reed per la cisteina ed il GSH (Fariss M.W., et al. 1987) ed Asensi per il GSSG (Asensi M., et al. 1999).

Dopo aver sedimentato la sospensione cellulare mediante centrifugazione (800 rpm, 8 min, 8°C), il *pellet* cellulare è stato risospeso in buffer fosfato (PBS) e fatto precipitare con acido perclorico (PCA, 10%). I gruppi tiolici

sono stati bloccati con l'aggiunta di acido iodacetico (IAA) a pH basico; quindi, gli analiti sono stati convertiti a derivati 2,4-dinitrofenili mediante l'aggiunta di 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) all'1% incubando i campioni a 4°C al buio per tutta la notte.

I campioni utilizzati per la valutazione del GSSG sono stati trattati con N-etil-maleimmide (NEM) 20 mM in PCA 6% al fine di bloccare i gruppi tiolici. Successivamente alla precipitazione ed alcalinizzazione del campione è stata effettuata la derivatizzazione mediante l'aggiunta di FDNB all'1%. La determinazione quantitativa degli analiti derivatizzati è stata condotta mediante HPLC dotato di colonna NH₂Spherisorb e di un detettore UV a 365 nm con un flusso pari a 1.25 ml/min. La fase mobile era mantenuta in una soluzione all'80% A (80% metanolo) e 20% B (sodio acetato 0.5 M in metanolo al 64%) per 5 minuti, seguita da un gradiente lineare di soluzione A 1% e B 99% per 10 minuti, la fase mobile era quindi mantenuta al 99% B per ulteriori 15 minuti al fine di consentire l'eluizione del GSSG. I dati ottenuti sono stati normalizzati con il quantitativo intracellulare di proteine ed espressi come µEq/mg di proteina.

6.7 Analisi dei livelli proteici con metodo Lowry

Il contenuto intracellulare di proteine è stato valutato mediante il metodo Lowry (Lowry O.H., et al. 1951). I campioni da analizzare sono stati incubati per 10 minuti con una soluzione contenente Na₂CO₃ 2% in NaOH 0.1 M, 1% K-Na-tartrato al 2% e 1% CuSO₄ all'1%. Successivamente i campioni sono stati incubati con la soluzione *Folin Ciocalteu's* 1:1 (Sigma) in acqua per 15 minuti e poi quantificati mediante analisi spettrofotometrica utilizzando una lunghezza d'onda di 760 nm. La concentrazione proteica dei campioni è stata valutata paragonando l'assorbanza dei campioni con quella della curva standard ottenuta con concentrazioni note di albumina di siero bovino (0.25-20 µg).

6.8 Analisi della sintesi di ATP

La sintesi di ATP è stata misurata con il metodo luciferina/luciferasi (Bianchi G., et al. 2015). Il saggio è stato condotto a 37° C per 2 minuti misurando la formazione di ATP a partire dall'ADP. A tal fine le cellule sono state incubate per 10 minuti con una soluzione costituita da Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), KCl 50 mM, EGTA 1 mM, EDTA 2mM, KH₂PO₄ 5 mM, MgCl₂ 2 mM, Uabaina 0.6 mM, Ampicillina 0.040 mg/ml, di(adenosina-5')penta-fosfato 0.2 mM, dipiruvato 0.2 mM e 5 mM addizionato a malato 2.5 mM. Successivamente la sintesi di ATP è stata indotta addizionando ADP 0.3 mM. Il contenuto di ATP è stato misurato mediante Luminometro (Triathler, Bioscan, Washington, D.C.) ed utilizzando il kit CLSII luciferina/luciferasi ATP bioluminescenza (Roche, Basel; Svizzera). Per la calibrazione sono state usate soluzioni standard di ATP (Roche, Basel, Svizzera) nell'intervallo di concentrazioni 10⁻¹⁰-10⁻⁷ M.

6.9 Analisi del consumo dell'ossigeno (OCR)

Al fine di misurare l'attività respiratoria, sono state analizzate 2x10⁶ cellule per ogni esperimento, usando un elettrodo amperometrico per O₂ posto in una cameretta isolata e mantenuto in agitazione a 37 °C. A tal fine, le cellule sono state risospese in una soluzione contenente NaCl 137 mM, KH₂PO₄ 5 mM, KCl 5 mM, EDTA 0.5 mM, MgCl 3 mM e di Tris-HCl 25 mM, pH 7.4, e permeabilizzate con digitonina 0.3 % per 10 minuti. Successivamente il campione è stato trasferito nella cameretta isolata e, mediante l'aggiunta di piruvato 5 mM e malato 2.5 mM, è stato misurato il tasso massimo di respirazione.

6.10 Analisi del consumo di glucosio

Il consumo di glucosio è stato valutato misurandone la concentrazione nel sovranatante, mediante uno spettrofotometro a doppio fascio (UNICAM UV2, Analitival S.n.c., PR, Italy), che rileva la riduzione del NADP a 340 nm sfruttando il sistema accoppiato esochinasi (HK) e glucosio-6-fosfato deidrogenasi. Il saggio è stato effettuato in una soluzione contenente Tris

HCl 100 nM pH 7.4, ATP 2 mM, NADP 10 mM, MgCl₂ 2 mM, HK 2 UI e G6PD 2 UI. La reazione è stata fatta iniziare dopo l'aggiunta di 5 µl di terreno di coltura cellulare.

6.11 Analisi del rilascio di acido lattico

La concentrazione di acido lattico rilasciato dalle cellule nel terreno di coltura è stata analizzata mediante analisi spettrofotometrica monitorando la riduzione del NAD⁺ a 340 nm. Il saggio è stato condotto in una soluzione contenente TrisHCl 100 nM (pH 8), NAD⁺ 5 mM e lattico deidrogenasi 1 UI/ml. I campioni sono stati analizzati prima e dopo l'aggiunta di 4 µg di lattico deidrogenasi purificata. I dati sono stati normalizzati con il numero di cellule.

6.12 Analisi della produzione di malondialdeide (MDA)

I livelli di malondialdeide (MDA) sono stati analizzati mediante il saggio dell'acido tiobarbiturico (TBARS, (Ravera S., et al. 2015). Questo metodo si basa sulla reazione dell'MDA, un prodotto che deriva dalla perossidazione lipidica, con l'acido tiobarbiturico. Al fine di valutare la concentrazione di MDA, 50 µg di proteine totali derivate da ogni campione sono stati dissolti in 300 µl di acqua milliQ, ed aggiunti a 600 µl di soluzione TBARS contenente acido tricloroacetico (TCA, 15%) e acido tiobarbiturico (TBA, 26 mM) in HCl 0,25 N. Tale miscela è stata incubata per 40 min a 100°C e quindi centrifugata (14000 rpm, 2 min). Successivamente, il sopranatante è stato raccolto ed analizzato allo spettrofotometro utilizzando una lunghezza d'onda di 532 nm. Al fine di calcolare la concentrazione di MDA dei singoli campioni, l'assorbanza dei medesimi è stata comparata con quella ottenuta da una curva standard valutata con concentrazioni note di MDA (0.75, 1 e 2 µM).

6.13 Estrazione delle proteine totali

Al termine dei trattamenti, le cellule sono state pellettate mediante centrifugazione (800 rpm per 8 min. a 8°C) e risospese in buffer di lisi (Tris

Hcl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 1 mM, NaF 50 mM, PMSF 1 mM) contenente una miscela di inibitori delle proteasi 7X (cOmplete Mini Protease, Roche) e Triton X-100 1% (Sigma). La sospensione cellulare, che era ulteriormente lisata facendola passare per 10 volte attraverso una siringa dotata di un ago da 25 Gauge, è stata quindi centrifugata (15'000 g, per 10 min, a 8°C; Heraeus Centrifuge Biofuge 28RS). Il sovranatante contenente le proteine totali è stato raccolto e conservato a -80°C.

6.14 Dosaggio delle proteine totali con metodo BCA

La quantità di proteine totali presenti nei campioni è stata determinata utilizzando Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Tale saggio misura la riduzione di Cu^{2+} a Cu^{+} in soluzione alcalina attraverso la reazione di Biureto utilizzando il reagente contenente acido bicinconico (BCA). Il BCA, in condizioni alcaline è un reagente altamente sensibile, stabile e specifico per il Cu^{+} . La colorazione porpora del prodotto è dovuto alla chelazione di 2 molecole di BCA con una di Cu^{+} , la cui intensità è proporzionale alla quantità di proteina presente.

La struttura macromolecolare delle proteine, il numero di legami peptidici e la presenza di particolari aminoacidi (cisteina, tirosina, triptofano e cistina) sono responsabili della formazione di colore con il BCA. La variazione di intensità è determinata mediante misure di assorbanza allo spettrofotometro a 570 nm (Lettore di piastre BioRad iMark). Il saggio si effettua su piastra da 96 pozzetti in cui vengono messi i campioni e gli standard ed aggiunto la miscela di reazione costituita da Soluzione A e B, fornite dal kit. Successivamente i campioni vengono incubati a 37°C per 30 min. e quindi letti allo spettrofotometro.

Le concentrazioni delle proteine totali dei campioni sono state determinate riferendosi ad una retta di taratura ottenuta utilizzando come campione di riferimento l'albumina di siero bovino (BSA) a concentrazione nota (mg/mL), mediante diluizioni progressive della BSA in acqua deionizzata.

6.15 Analisi dei livelli di proteina con *immunoblotting*

L'espressione dei livelli proteici è stata valutata mediante immunoblotting ed utilizzando 15 µg di proteine totali a cui è stato aggiunto *Laemmli buffer* 3.5x (Tris HCl 2.4 mM, glicerolo 43 mM, Sodio-dodecil-solfato (SDS) 2.8 mM, blu di bromofenolo 1%, β-mercapto-etanolo 62.5 mM), quale agente denaturante. Successivamente i campioni sono stati denaturati a 100°C per 5 min. e sottoposti ad elettroforesi utilizzando Mini-PROTEAN TGX™ *Precast Gels* (Biorad) 4-20%. Al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite, mediante elettroblotting, su membrana *Hybond P 0.45* PVDF (Polivinilidenfluoruro, Amersham) che è stata successivamente colorata con una soluzione di rosso Ponceau al fine di verificare l'avvenuto trasferimento. La PVDF è stata quindi incubata per 90 min. con una soluzione di latte al 5% in PBS-Tween (Na₂HPO₄ 80mM, NaH₂PO₄·2H₂O 20 mM, NaCl 100 mM pH 7,5, Tween20 0.025% al fine di saturare i siti aspecifici. Dopo alcuni lavaggi con TBS (Trizma base 20 mM, NaCl 0.5 mM, pH 7.5/Tween20 0.025% (TBS-T) le membrane sono state incubate *overnight* a 4°C con gli anticorpi primari: monoclonale di *mouse* anti- tubulina (0.5 µg/ml, Abcam) e policlonale di *rabbit* anti-glutatione perossidasi 4 (Gpx4; 1 µg/ml, Abcam). Successivamente, le membrane sono state lavate con TBS-T e incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpo secondario anti-*mouse* (1:10'000, Amersham) o anti-*rabbit* (1:5000, Amersham) coniugati con la perossidasi. Dopo opportuni lavaggi la rilevazione delle proteine è stata effettuata con il sistema di chemiluminescenza ECL (Amersham per proteine *housekeeping* o Thermofisher Scientific per le altre proteine), ed i livelli di espressione delle proteine sono stati determinati mediante analisi densitometrica delle lastre (Gel Doc 2000; BioRad).

6.16 Analisi statistica dei risultati

I risultati presentati sono espressi come valor medio ± SEM e derivano dai dati ottenuti da 3 esperimenti indipendenti. La significatività statistica delle

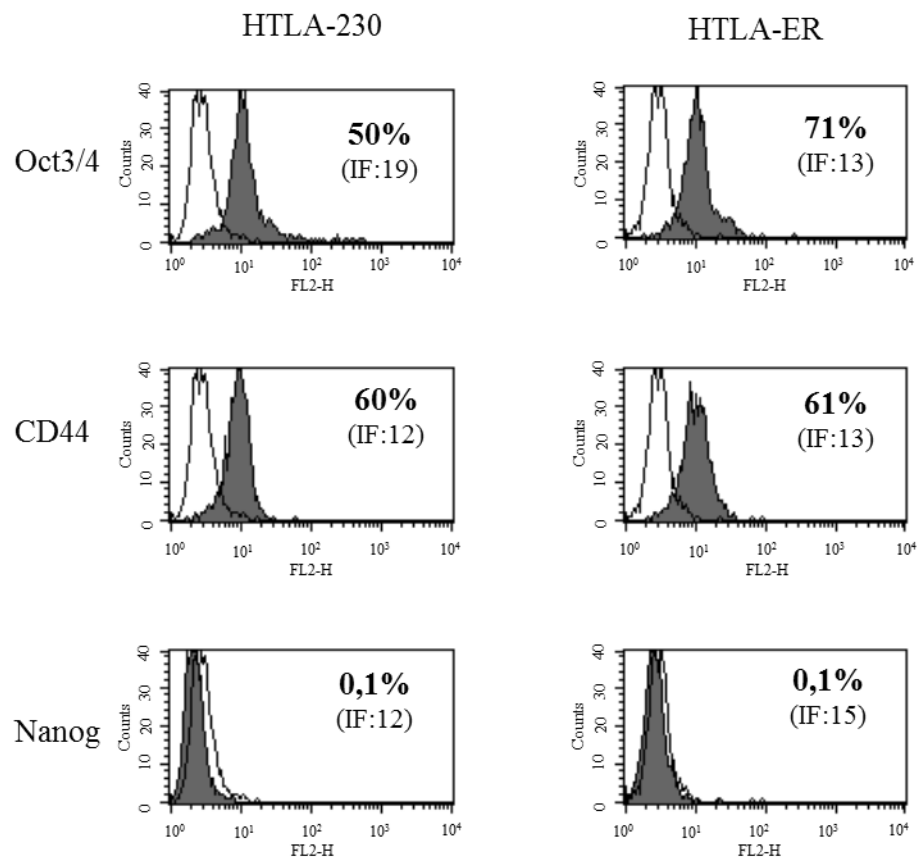
differenze tra i vari gruppi sperimentali presi in esame è stata valutata mediante analisi ANOVA ad una via seguita dal test di Dunnet per la comparazione multipla dei risultati.

7. RISULTATI

7.1 Le neurosfere selezionate dalle cellule HTLA-230 e HTLA-ER esprimono i marcatori di staminalità Oct3/4 e CD44.

Al fine di verificare che le neurosfere selezionate dalle cellule adese HTLA-230 e HTLA-ER fossero costituite da cellule staminali, l'espressione di Oct3/4, CD44 e Nanog, noti *markers* di staminalità, è stata analizzata mediante immunofluorescenza e analisi citofluorimetrica. Come è possibile osservare dai grafici riportati in Fig. 17, sia le cellule adese (Fig. 17A) che le neurosfere (Fig. 17B) esprimevano elevati livelli di Oct3/4 e CD44, mentre non esprimevano Nanog; l'assenza di tale marcatore, nelle popolazioni cellulari esaminate, confermava l'analisi mediante PCR dell'RNA messaggero di Nanog (dati non mostrati). Sulla base di tali evidenze risulta che le cellule adese possiedono caratteri di staminalità e che tale proprietà viene mantenuta nelle neurosfere che da esse originano; pertanto, nei paragrafi successivi, le due popolazioni di neurosfere sono state indicate come cellule staminali del cancro (CSC).

A)



B)

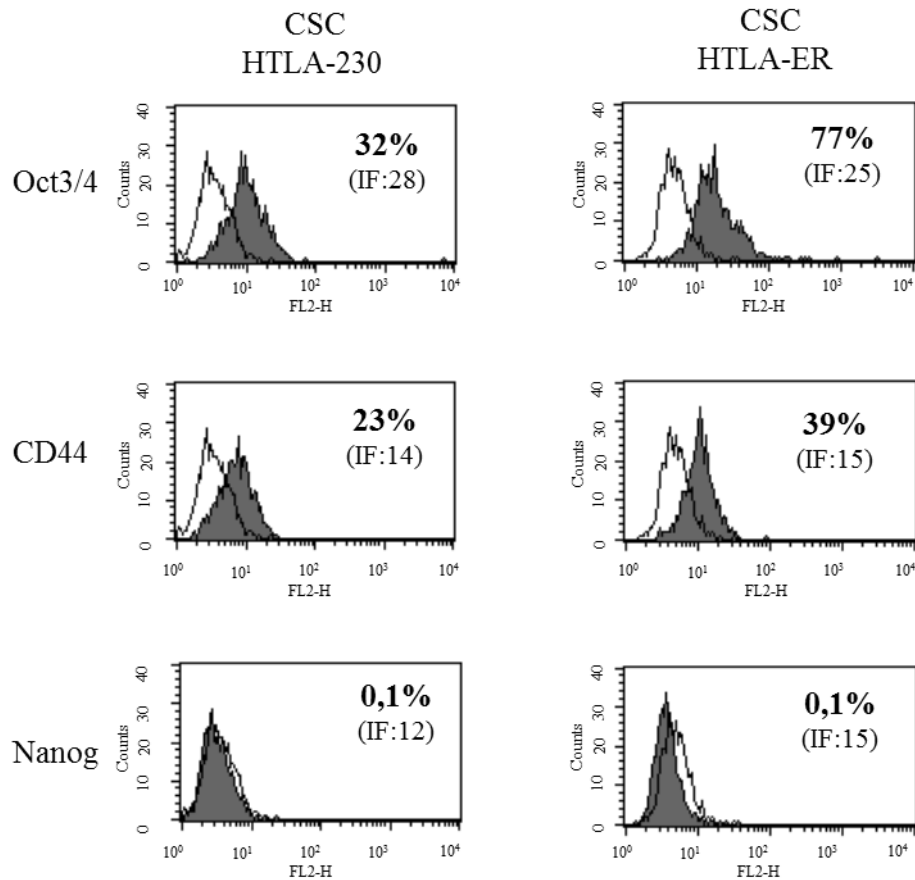


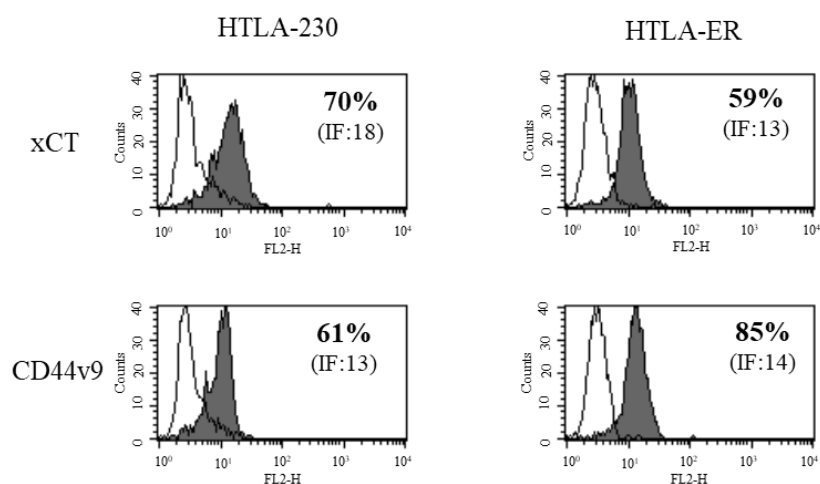
Figura 17. Le cellule adese HTLA-230 e HTLA-ER (A), così come le neurosfere da esse derivate (B), esprimono *markers* di staminalità. Le cellule adese HTLA-230 e HTLA-ER e le neurosfere da esse derivate sono state permeabilizzate e analizzate mediante immunofluorescenza e analisi citofluorimetrica al fine di valutare l'espressione di Oct3/4, CD44 e Nanog. I grafici riportano sull'asse delle ascisse l'intensità di fluorescenza (IF) in scala logaritmica (unità arbitrarie) e su quello delle ordinate il numero di cellule analizzato. I profili in grigio indicano le colorazioni con l'anticorpo indicato, mentre i profili bianchi rappresentano i controlli, in cui le cellule sono state incubate solamente con l'anticorpo secondario. In ogni riquadro è riportata in alto a destra la percentuale di cellule che esprimono la proteina di interesse e l'intensità di fluorescenza del segnale.

7.2 Le CSC delle HTLA-230 e HTLA-ER esprimono xCT e CD44v9

Dal momento che in questo studio sono state utilizzate due sostanze in grado di inibire xCT (canale antiporto di glutammato e cistina), è stata analizzata l'espressione di xCT e quella del recettore CD44v9, implicato nella sua stabilizzazione in membrana (Nagano O., et al. 2004). Come si

può osservare nella Fig. 18, mentre le cellule adese resistenti mostravano una lieve diminuzione di xCT ed un aumento di CD44v9 rispetto alle parentali adese (pannello A), le CSC resistenti presentavano una maggiore espressione sia di xCT che di CD44v9 rispetto alle CSC delle cellule parentali (pannello B).

A)



B)

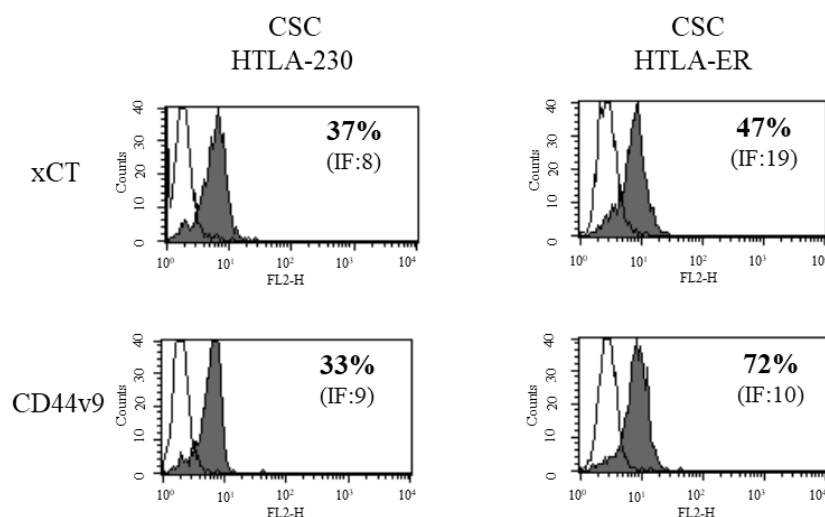


Figura 18. Le CSC di entrambe le popolazioni cellulari esprimono xCT e CD44v9. Le cellule adese HTLA-230 e HTLA-ER (A) e le CSC da esse derivate (B) sono state permeabilizzate e analizzate mediante immunofluorescenza al fine di valutare l'espressione di xCT e CD44v9. I grafici riportano sull'asse delle ascisse l'intensità di fluorescenza (IF) in scala logaritmica (unità arbitrarie) e su quello delle ordinate il numero di cellule analizzato. I profili in grigio indicano le colorazioni con l'anticorpo indicato mentre i profili bianchi rappresentano i

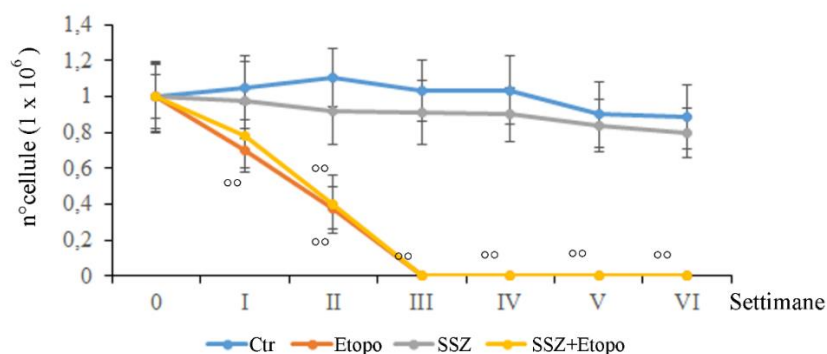
controlli, in cui le cellule sono state incubate solamente con l'anticorpo secondario. In ogni riquadro è riportata in alto a destra la percentuale di cellule che esprimono le proteine di interesse e l'intensità di fluorescenza del segnale.

7.3 L'Etoposide impedisce la formazione di neurosfere derivate dalle cellule HTLA-230 dopo 3 settimane di trattamento.

Come è possibile osservare dai grafici riportati nella Fig. 19 (pannelli A e B), nelle CSC selezionate dalle cellule HTLA-230, il trattamento con Etoposide inibiva la propagazione cellulare del 35% già a partire dalla prima settimana e portava alla totale assenza di CSCs alla terza. Il trattamento con Sulfasalazina (SSZ), inibitore di xCT (Fig. 19 A) o con C 2-4, inibitore di PKC α (Fig. 19 B), non alterava in maniera significativa la capacità proliferativa delle CSC. Il co-trattamento con Etoposide e SSZ (Fig. 19 A) o con Etoposide con C 2-4 (Fig. 19 B) non portava a risultati significativamente diversi rispetto a quelli osservati nelle cellule trattate con con la sola Etoposide.

Sulla base di tali dati, risulta che l'Etoposide, somministrato come singolo farmaco, è efficace nel contrastare la propagazione delle CSC derivate dalle HTLA-230.

A)



B)

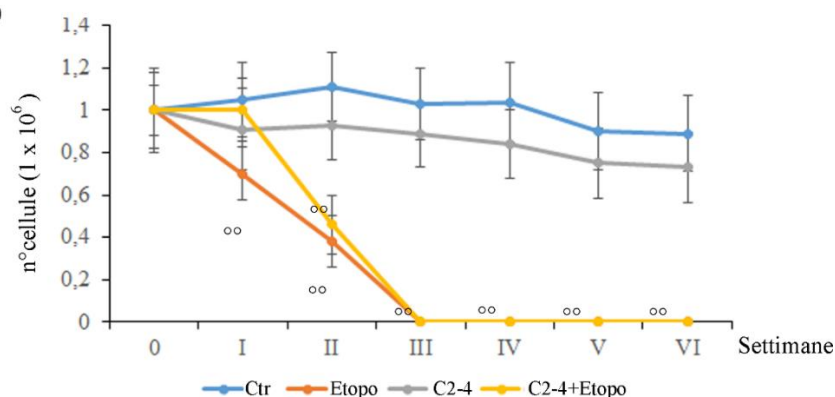


Figura 19. Nelle CSC derivate dalle HTLA-230, il trattamento con Etoposide inibisce totalmente la propagazione cellulare già a partire dalla terza settimana. Le CSC derivate dalle HTLA-230 sono state sottoposte ai trattamenti con Etoposide (1.25 μ M), SSZ (5 μ M) (A) e C 2-4 (0.1 μ M) (B), da soli o in combinazione con Etoposide per 6 settimane. Il grafico mostra il numero di cellule (ordinata) che viene registrato ad ogni settimana (ascissa). I dati sono la media $\pm$ S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. ^{oo} $p < 0.01$ vs CSC HTLA-230 controllo (Ctr).

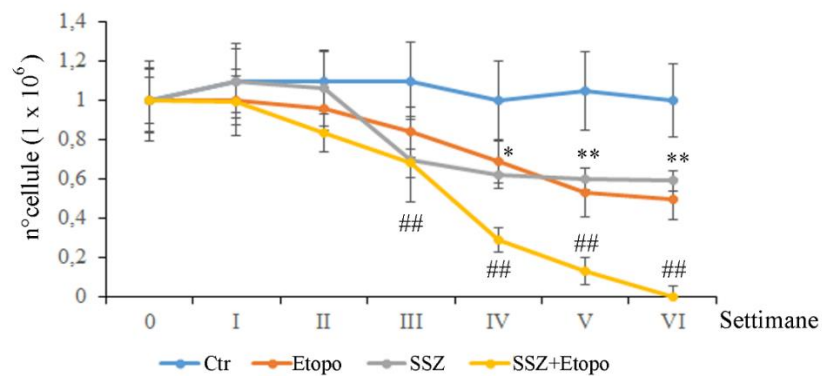
7.4 I co-trattamenti di Etoposide con SSZ o con l'inibitore di PKC α sono più efficaci dell'Etoposide da sola nell'impedire la formazione delle neurosfere derivanti dalle cellule HTLA-ER.

Il trattamento con Etoposide delle CSC ottenute dalle HTLA-ER inibiva del 38% la propagazione cellulare a partire dalla quarta settimana e tale effetto si manteneva costante sino alla sesta ed ultima settimana di trattamento (Fig. 20 A e B). Il trattamento con SSZ inibiva la propagazione cellulare in maniera paragonabile all'Etoposide da sola (Fig. 20 A), mentre il

trattamento con il C 2-4 non modificava la propagazione delle cellule non trattate (Fig. 20 B). I co-trattamenti di Etoposide e SSZ o Etoposide e C 2-4 inibivano efficientemente la totale propagazione cellulare alla sesta settimana (Fig. 20 A e B).

Sulla base di tali dati, risulta che la capacità da parte dell'Etoposide di inibire la propagazione cellulare si manifesta più tardivamente nelle CSC selezionate dalle HTLA-ER rispetto a quelle ottenute dalle HTLA-230. Inoltre, i co-trattamenti risultavano essere efficaci nel favorire l'azione antiproliferativa dell'Etoposide.

A)



B)

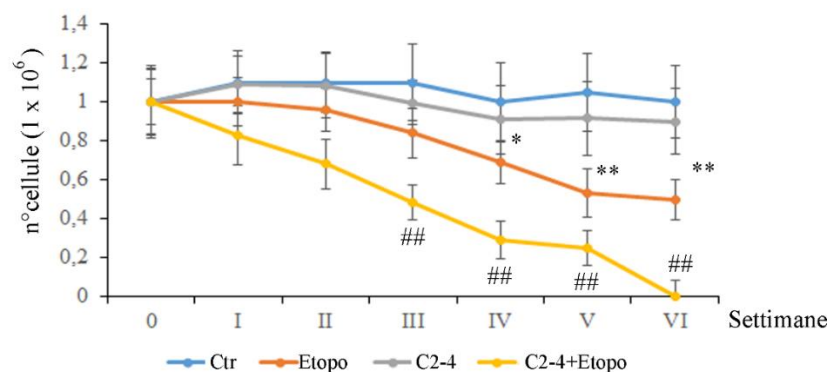


Figura 20. Nelle CSC originate dalle HTLA-ER, il trattamento con Etoposide riduce la proliferazione cellulare a partire dalla quarta settimana ed i co-trattamenti sono in grado di anticipare l'azione antiproliferativa dell'Etoposide.

Le CSC derivate dalle HTLA-ER sono state trattate con Etoposide (1.25 μ M), SSZ (5 μ M) (A) o C 2-4 (0.1 μ M) (B), da soli o in

combinazione con Etoposide per 6 settimane. Il grafico mostra il numero di cellule (ordinata) che viene registrato ad ogni settimana (ascissa). I dati sono la media $\pm$ S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$ vs CSC HTLA-ER Ctr, ** $p < 0.01$ vs CSC HTLA-ER Ctr; ## $p < 0.01$ vs CSC HTLA-ER + Etoposide.

7.5 Il trattamento con Etoposide induce una marcata deplezione di GSH nelle CSC derivate dalle cellule HTLA-230 dopo 2 settimane e nelle CSC derivate dalle cellule HTLA-ER dopo 5 settimane.

Le CSC delle HTLA-230 e delle HTLA-ER avevano livelli paragonabili di GSH, rispettivamente pari a 17.07 e 17.37 $\mu\text{Eq/g}$ di proteine totali.

Come si osserva dal grafico (Fig. 21 A), il trattamento delle CSC originate dalle HTLA-230 con Etoposide per 2 settimane causava una marcata riduzione dei livelli di GSH pari all'80% rispetto alla popolazione cellulare non trattata. La SSZ o il C 2-4, somministrati singolarmente, non alteravano i livelli di GSH ed i co-trattamenti di Etoposide con tali sostanze non modificavano l'effetto depletante dell'Etoposide.

Differente era il comportamento delle CSC originate dalle HTLA-ER trattate con Etoposide per 2 settimane. Infatti, per nessuno dei trattamenti o co-trattamenti effettuati si osservava un'alterazione significativa dei livelli intracellulari di GSH (Fig. 21 A) rispetto ai valori delle cellule non trattate.

Dopo 5 settimane, le CSC delle HTLA-230 e HTLA-ER non trattate avevano un contenuto di GSH pari a 4,7 $\mu\text{Eq/g}$ e 8,99 $\mu\text{Eq/g}$ di proteine, rispettivamente. Dopo 5 settimane di trattamento con Etoposide, da sola o in combinazione con gli inibitori, non è stato possibile analizzare i livelli di GSH nelle CSC (HTLA-230) in quanto le cellule non si erano propagate (vedi Fig. 19 B). I trattamenti con SSZ o C2-4 incrementavano, anche se in maniera non significativa, i livelli di GSH nelle CSC originate dalle HTLA-230.

Risultati diversi sono stati ottenuti nelle CSC delle HTLA-ER. Infatti, dopo 5 settimane di trattamento con Etoposide si osservava una riduzione del 60% dei livelli di GSH rispetto alle cellule non trattate ed i co-trattamenti

con SSZ o C 2-4 non modificavano l'effetto depletante dell'Etoposide (Fig. 21 B).

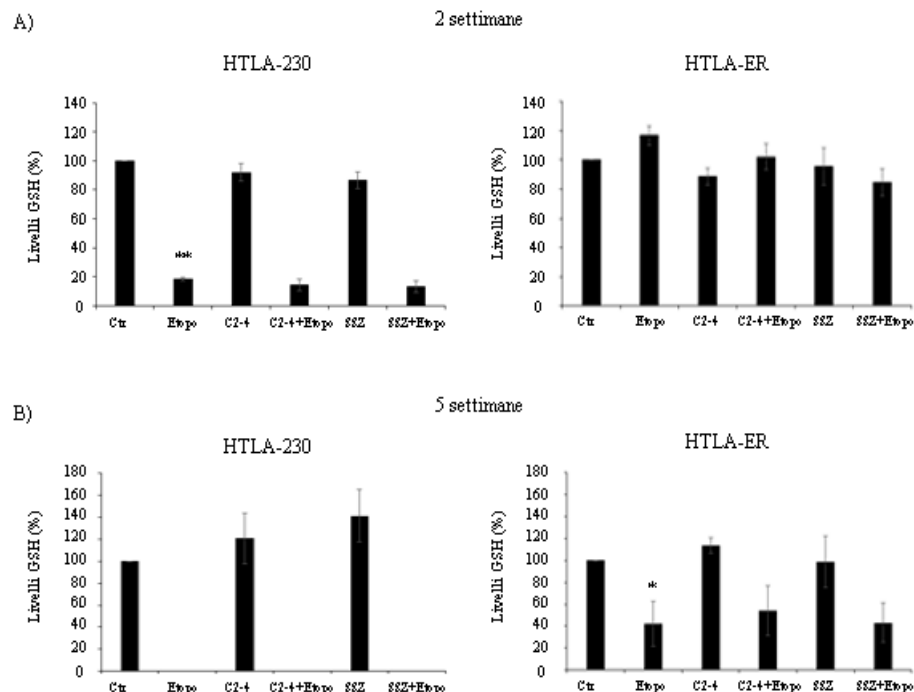


Figura 21. Variazione dei livelli di GSH nelle CSC originate dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER trattate con Etoposide e/o inibitori per 2 e 5 settimane.

Le CSC derivate dalle HTLA-230 e quelle derivate dalle HTLA-ER sono state sottoposte ai trattamenti con Etoposide (1.25 μ M), C 2-4 (0.1 μ M) o SSZ (5 μ M) da soli o in combinazione con Etoposide per 2 settimane (A) o 5 settimane (B). I grafici relativi alle 2 e alle 5 settimane mostrano il contenuto percentuale di GSH (ordinata) che viene registrato dopo ogni trattamento (ascissa) rispetto al controllo. I dati sono riportati come media $\pm$ S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. * $p < 0.01$ vs CSC HTLA-ER Ctr, ** $p < 0.01$ vs CSC HTLA-230 Ctr.

Per quanto riguarda il GSSG, forma ossidata del GSH, non è stato possibile analizzarne i livelli in entrambe le popolazioni cellulari durante le prime due settimane di trattamenti poichè essi risultavano essere al di sotto del limite di detezione dello strumento utilizzato per l'analisi.

Il contenuto di GSSG era apprezzabile in entrambe le popolazioni cellulari dopo 5 settimane, ma solo nelle CSC derivate dalle HTLA-ER era depletato dopo trattamento con Etoposide ed i co-trattamenti con C 2-4 o SSZ sembravano non alterare tale situazione (dati non mostrati).

7.6 Il trattamento con Etoposide delle CSC originate dalle HTLA-ER dopo 2 e 5 settimane induce un incremento dei livelli di cisteina.

Le CSC delle HTLA-230 e delle HTLA-ER avevano livelli di cisteina pari a 9.04 e 10.11 uEq/g proteine, rispettivamente. Come si può osservare nella Fig. 22, i livelli di cisteina nelle CSC delle HTLA-230 non subivano variazioni significative dopo 2 settimane di trattamento con Etoposide, mentre un incremento del 50% era osservato nelle CSC delle HTLA-ER. Il trattamento con gli inibitori, C2-4 e SSZ, somministrati singolarmente causava, nelle CSC delle HTLA-ER, un aumento dei livelli di cisteina pari al 40% e 13% rispettivamente, mentre non aveva alcun effetto sulle CSC delle HTLA-230. Dopo 5 settimane (22 B), le popolazioni di CSC non trattate avevano livelli paragonabili di cisteina (14-16 μ Eq/g di proteina) ed il trattamento con Etoposide induceva solamente nelle CSC delle HTLA-ER, un aumento del 60% dei livelli di tale aminoacido. Tale incremento era inoltre mantenuto anche nelle cellule co-trattate (C2-4+Etoposide e SSZ+Etoposide).

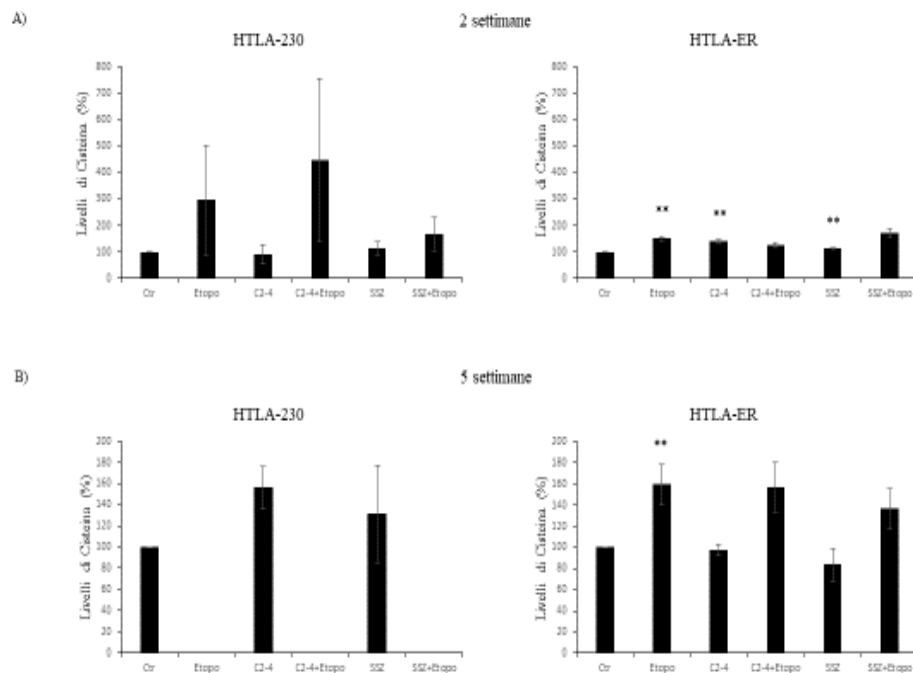


Figura 22. Variazione dei livelli di cisteina totale nelle CSC originate dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER trattate con Etoposide e/o inibitori per 2 e 5 settimane. Le CSC derivate dalle HTLA-230 e quelle derivate dalle HTLA-ER sono state trattate con Etoposide (1.25 μ M), C 2-4 (0.1 μ M) o SSZ (5 μ M) da soli o in combinazione con Etoposide per 2 settimane (A) o 5 settimane (B). I grafici relativi alle 2 e alle 5 settimane mostrano il contenuto percentuale di cisteina totale intracellulare (ordinata) che viene registrato dopo ogni trattamento (ascissa) rispetto al controllo. I dati sono riportati come media $\pm$ S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. **** $p < 0,01$ vs CSC HTLA-230 (Ctr).**

7.7 La sintesi di ATP nelle CSC derivate dalle HTLA-230 è diminuita già dopo 2 settimane di trattamento con Etoposide, mentre tale effetto si osserva nelle CSC delle HTLA-ER dopo 5 settimane ed in presenza di C 2-4 o SSZ.

Al fine di valutare la suscettibilità delle due popolazioni di CSC ai diversi trattamenti, è stato analizzato lo stato energetico partendo dalla misurazione della sintesi di ATP. Come si osserva nella Fig. 23 A, il trattamento con Etoposide per due settimane, era in grado di ridurre di oltre il 70% la produzione di ATP nelle CSC delle HTLA-230. Anche i trattamenti singoli con C 2-4 o SSZ diminuivano i livelli di ATP ma in maniera meno marcata rispetto all'Etoposide il cui effetto era potenziato quando era somministrata in presenza di C 2-4 o SSZ (Fig. 23 A).

Nelle CSC delle HTLA-ER, è emerso che il trattamento con Etoposide o con i singoli inibitori per 2 settimane non alterava in maniera significativa la sintesi di ATP e solo il co-trattamento con SSZ era in grado di ridurre i livelli di ATP del 25% rispetto alle cellule trattate con il chemioterapico da solo (Fig. 23 A).

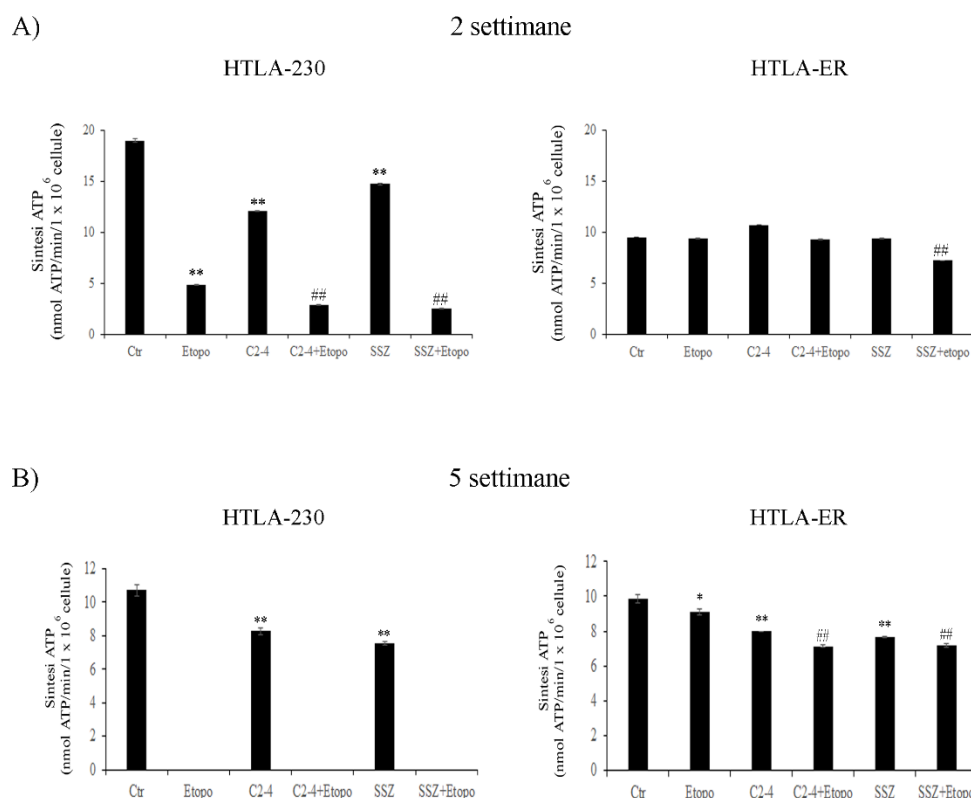


Figura 23. Sintesi di ATP nelle CSC originate dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER trattate con Etoposide e/o inibitori per 2 e 5 settimane.

Le CSC derivate dalle HTLA-230 e quelle derivate dalle HTLA-ER sono state sottoposte ai trattamenti con Etoposide (1.25 μ M), C 2-4 (0.1 μ M) o SSZ (5 μ M) da soli o in combinazione con Etoposide per 2 settimane (A) o 5 settimane (B). I grafici relativi alle 2 e alle 5 settimane mostrano i livelli di ATP (ordinata) che vengono registrato dopo ogni trattamento (ascissa) rispetto al controllo. I dati sono riportati come media $\pm$ S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. * p < 0.05 vs CSC HTLA-ER Ctr; ** p < 0.01 vs CSC HTLA-230 Ctr o vs CSC HTLA-ER Ctr; ## p < 0.01 vs CSC HTLA-230+Etoposide o vs CSC HTLA-ER+Etoposide.

Come si osserva nella Fig. 23 B, il trattamento con Etoposide dopo 5 settimane azzerava la sintesi di ATP da parte delle CSC delle HTLA-230 a causa della mancata formazione di neurosfere (vedi Fig. 19 B). Tale risultato si manteneva anche nei co-trattamenti con C 2-4 o SSZ.

Nelle CSC delle HTLA-ER, il trattamento combinato di Etoposide con C 2-4 o SSZ, protratto per 5 settimane, era in grado di ridurre i livelli di ATP del 25% rispetto a quanto rilevato nelle cellule esposte ad Etoposide da sola (Fig. 23 B).

Inoltre, dall'analisi della Fig. 23 emerge che i trattamenti singoli con C 2-4 o SSZ erano in grado di inibire in maniera significativa rispetto al controllo la sintesi di ATP nelle CSC delle HTLA-230 sia dopo 2 che 5 settimane e nelle CSC delle HTLA-ER dopo 5 settimane di trattamento.

7.8 Il consumo di O₂ nelle CSC delle HTLA-230 è diminuito già dopo 2 settimane di trattamento con Etoposide da sola o in associazione con C 2-4 o SSZ mentre nelle CSC delle HTLA-ER gli stessi trattamenti singoli e combinati protratti per 2 o 5 settimane non alterano il consumo di O₂ dei controlli.

Parallelamente alla diminuzione della sintesi di ATP, è stato osservato che il trattamento con Etoposide per 2 settimane delle CSC delle HTLA-230 causava una riduzione del consumo di O₂ pari al 75% rispetto alle cellule non trattate (Fig. 24 A). Risultati analoghi erano registrati in presenza di co-trattamento con C 2-4 o SSZ (Fig. 24 A).

Nessuna variazione del consumo di O₂ era osservata dopo 2 settimane, nelle CSC delle HTLA-ER sottoposte a trattamento con Etoposide da sola o in combinazione con gli inibitori (Fig. 24 A). Come si osserva nella Fig. 24 B il trattamento con Etoposide dopo 5 settimane azzerava il consumo di O₂ nelle CSC delle HTLA-230 a causa della mancata formazione di neurosfere (vedi Fig. 19 B). I co-trattamenti con C 2-4 o SSZ non modificavano tale parametro (Fig. 24 B). Gli stessi trattamenti singoli e combinati condotti per 5 settimane nelle CSC delle HTLA-ER non alteravano in maniera significativa il consumo di O₂ (Fig. 24 B).

E' da notare che le somministrazioni singole per 2 settimane con C 2-4 o SSZ avevano un diverso impatto sul consumo di O₂ nelle due popolazioni di CSC. Infatti il C 2-4 e la SSZ inibivano il consumo di ossigeno del 40% e del 25% rispettivamente nelle CSC delle HTLA-230 mentre lo aumentavano del 15% e del 35% rispettivamente nelle CSC (HTLA-ER).

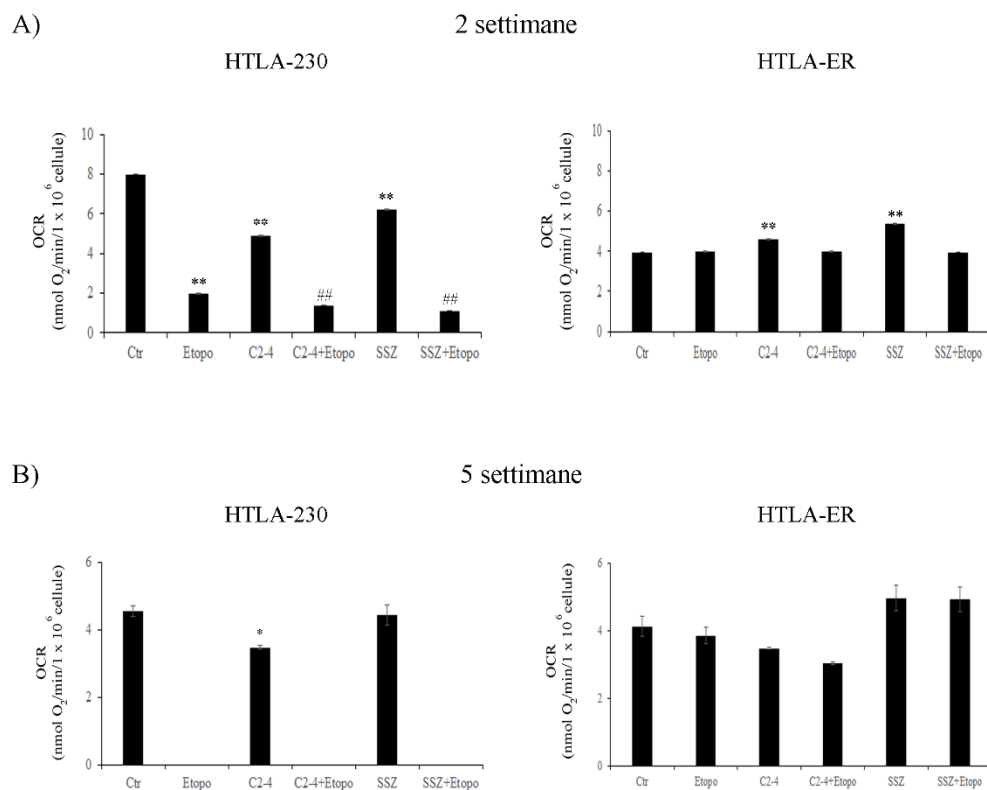


Figura 24. Consumo di O₂ nelle CSC originate dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER trattate con Etoposide e/o inibitori per 2 e 5 settimane.

Le CSC derivate dalle HTLA-230 e quelle derivate dalle HTLA-ER sono state sottoposte ai trattamenti con Etoposide (1.25 μ M), C 2-4 (0.1 μ M) o SSZ (5 μ M), da soli o in combinazione con Etoposide per 2 settimane (A) o 5 settimane (B). I grafici relativi alle 2 e alle 5 settimane mostrano i consumi di O₂ (ordinata) che vengono registrati dopo ogni trattamento (ascissa) rispetto al controllo. I dati sono riportati come media $\pm$ S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. * p < 0.05 vs CSC HTLA-230 Ctr; ** p < 0.01 vs CSC HTLA-230 Ctr o vs CSC HTLA-ER Ctr; ## p < 0.01 vs CSC HTLA-230+Etoposide o vs CSC HTLA-ER+Etoposide.

Dalle analisi relative alla sintesi di ATP e consumo di O₂ è stato possibile ricavare il rapporto P/O il cui valore fisiologico è pari a 2.3 ± 0.2 (Hinkle P.C., 2005). Come si evince dalla Fig. 25, la somministrazione di SSZ, singola o in associazione con l'Etoposide, causava un decremento del rapporto P/O (1.8 ± 0.15) in entrambe le popolazioni CSC dopo 2 e 5 settimane. Tale dato dimostra che, in tutte le condizioni di trattamento, la SSZ è in grado di esercitare un'azione disaccoppiante sulla fosforilazione ossidativa.

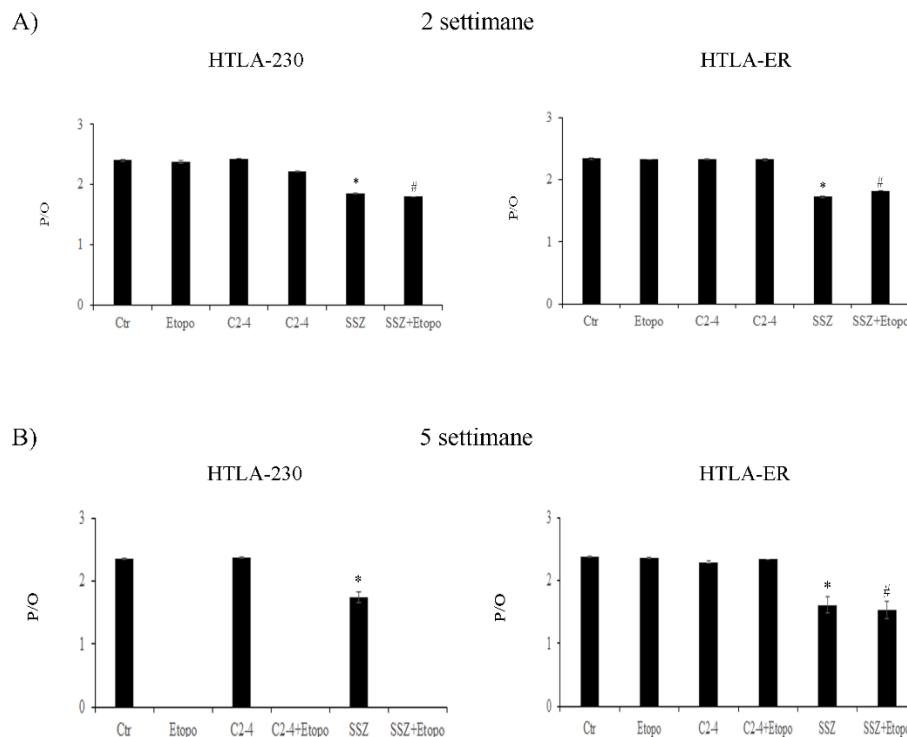


Figura 25. Rapporto P/O nelle CSC originate dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER trattate con Etoposide e/o inibitori per 2 e 5 settimane.

Le CSC derivate dalle HTLA-230 e quelle derivate dalle HTLA-ER sono state sottoposte ai trattamenti con Etoposide (1.25 μ M), C 2-4 (0.1 μ M) o SSZ (5 μ M), da soli o in combinazione con Etoposide per 2 settimane (A) o 5 settimane (B). I grafici relativi alle 2 e alle 5 settimane mostrano i rapporti P/O (ordinata) che vengono registrati dopo ogni trattamento (ascissa) rispetto al controllo. I dati sono riportati come media $\pm$ S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. * p < 0.05 vs CSC HTLA-230 Ctr o CSC HTLA-ER Ctr; # p < 0.05 vs CSC HTLA-230+Etoposide o vs CSC HTLA-ER+Etoposide.

7.9 Il trattamento per 2 settimane con Etoposide da sola o in associazione con C 2-4 o SSZ induce un aumento del consumo di glucosio e della produzione di acido lattico nelle CSC delle HTLA-230. Gli stessi trattamenti per 2 e 5 settimane portano ad aumento del consumo di glucosio nelle CSC delle HTLA-ER mentre solo l'associazione di Etoposide con C 2-4 o SSZ è in grado di aumentare il rilascio di acido lattico da parte delle stesse.

Al fine di completare l'analisi del quadro metabolico è stato valutato l'effetto dei diversi trattamenti sul consumo di glucosio e sulla produzione di acido lattico. Come si può osservare nella Fig. 26 A, nelle CSC delle HTLA-230, trattate con Etoposide per 2 settimane, il consumo di glucosio aumentava del 60% rispetto alle cellule non trattate ed il co-trattamento con C 2-4 o SSZ non modificava l'effetto dell'Etoposide.

Nelle CSC delle HTLA-ER, i trattamenti singoli con Etoposide o C 2-4 o SSZ aumentavano il consumo di glucosio del 30% ed i trattamenti combinati di Etoposide con C 2-4 o SSZ, erano in grado di aumentare tale consumo del 60% e 25% rispettivamente rispetto alle cellule trattate con sola Etoposide (Fig. 26 A).

Come si osserva nella Fig. 26 B, il trattamento con Etoposide dopo 5 settimane azzerava il consumo di glucosio da parte delle CSC (HTLA-230) a causa della mancata formazione di neurosfere (vedi Fig. 19 B). Tale risultato si manteneva anche nei co-trattamenti con C 2-4 o SSZ.

E' da notare che dopo 5 settimane solo il trattamento singolo con SSZ aumentava del 25% il consumo di glucosio nelle CSC derivate dalle HTLA-230 (Fig. 26 B).

Nelle CSC delle HTLA-ER, il trattamento con Etoposide o con i singoli inibitori dopo 5 settimane induceva un incremento del consumo di glucosio pari al 20% rispetto alle cellule non trattate ed i co-trattamenti erano in grado di aumentare del 15% il consumo di glucosio rispetto alle cellule trattate con Etoposide da sola (Fig. 26 B).

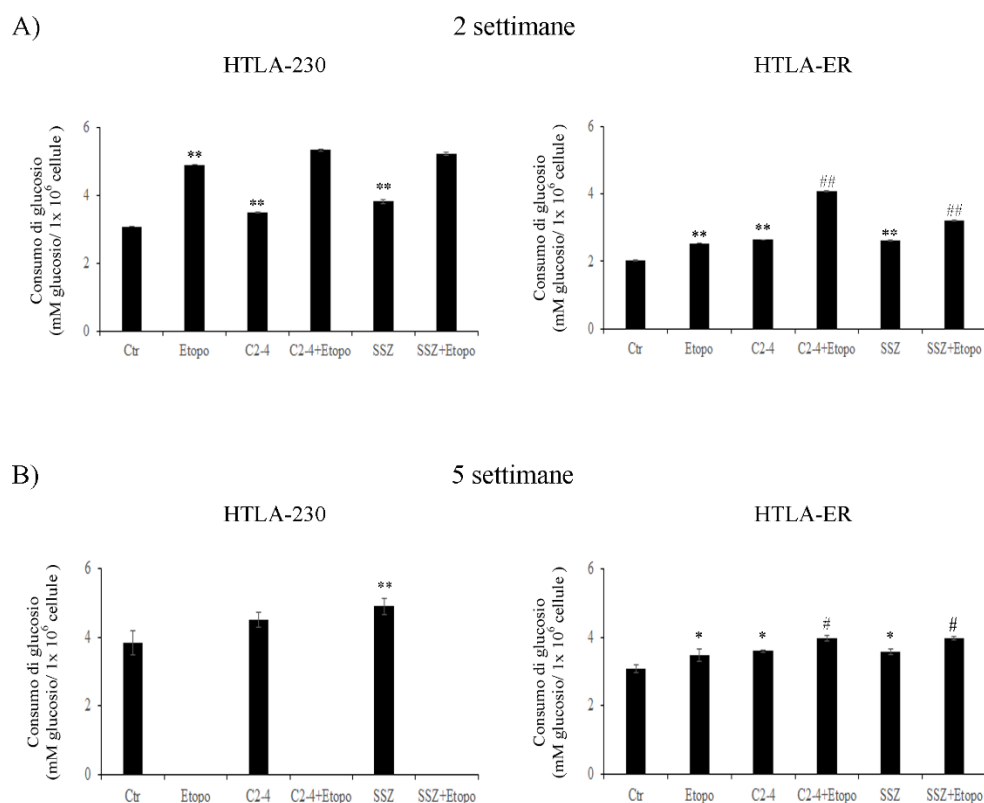


Figura 26. Consumo di glucosio nelle CSC originate dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER trattate con Etoposide e/o inibitori per 2 e 5 settimane.

Le CSC derivate dalle HTLA-230 e quelle derivate dalle HTLA-ER sono state sottoposte ai trattamenti con Etoposide (1.25 μ M), C 2-4 (0.1 μ M) o SSZ (5 μ M), da soli o in combinazione con Etoposide per 2 settimane (A) o 5 settimane (B). I grafici relativi alle 2 e alle 5 settimane mostrano i consumi di glucosio (ordinata) che vengono registrati dopo ogni trattamento (ascissa) rispetto al controllo. I dati sono riportati come media $\pm$ S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. * p < 0.05 vs CSC HTLA-ER; ** p < 0.01 vs CSC HTLA-230 Ctr o vs CSC HTLA-ER Ctr; # p < 0.05 vs CSC HTLA-ER + Etoposide; ## p < 0.01 vs CSC HTLA-ER+Etoposide.

Dalle analisi del rilascio di acido lattico, si è osservato che, dopo 2 settimane, il trattamento con Etoposide, da sola o in combinazione con C 2-4 o con SSZ, nelle CSC delle HTLA-230 induceva un aumento di acido lattico pari a circa l'80% rispetto alle cellule non trattate, mentre i singoli inibitori non alteravano in maniera significativa tale parametro (Fig. 27 A). Nelle CSC delle HTLA-ER, il trattamento con Etoposide non induceva variazioni significative del rilascio di acido lattico, mentre i livelli aumentavano del 70% nelle cellule esposte ai co-trattamenti di Etoposide

con C 2-4 o SSZ (Fig. 27 B). E' da notare che il trattamento singolo con C 2-4 o SSZ stimolava la produzione di acido lattico del 60% e 20% rispettivamente rispetto alle cellule non trattate (Fig. 27 B).

Come si osserva nella Fig. 27 B, il trattamento con Etoposide dopo 5 settimane azzerava la produzione di acido lattico da parte delle CSC delle HTLA-230 a causa della mancata formazione di neurosfere (vedi Fig. 19 B). Tale risultato si manteneva anche nei co-trattamenti con C 2-4 o SSZ mentre i trattamenti singoli con C 2-4 o SSZ non alteravano la produzione di acido lattico rilevata nelle CSC delle HTLA-230 non trattate (Fig. 27 B).

Analogamente a quanto rilevato dopo 2 settimane, dopo 5 settimane, nelle CSC delle HTLA-ER il trattamento con Etoposide non induceva variazioni significative del rilascio di acido lattico e livelli analoghi a quelli delle non trattate (Ctr) si registravano anche nelle CSC trattate con C 2-4 o SSZ (Fig. 27 B). Invece, entrambi i trattamenti combinati di Etoposide con gli inibitori incrementavano la produzione di acido lattico del 30% rispetto ai campioni trattati con il singolo chemioterapico (Fig. 27 B).

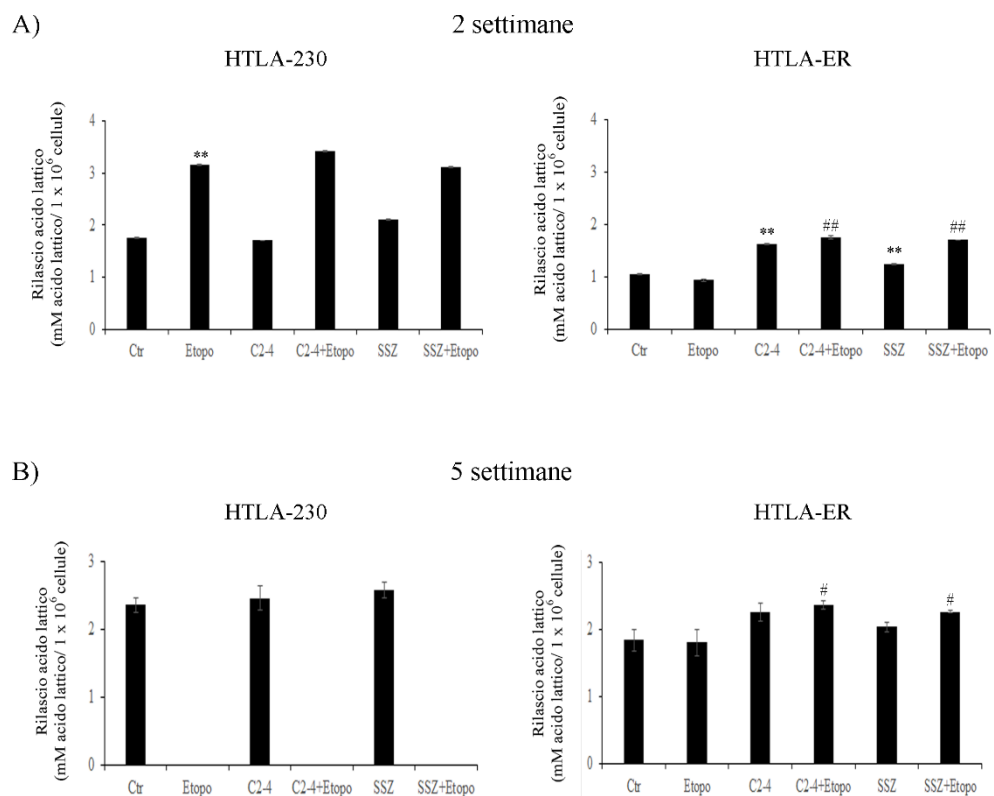


Figura 27. Rilascio di acido lattico nelle CSC originate dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER trattate con Etoposide e/o inibitori per 2 e 5 settimane.

Le CSC derivate dalle HTLA-230 e quelle derivate dalle HTLA-ER sono state sottoposte ai trattamenti con Etoposide (1.25 μ M), C 2-4 (0.1 μ M) o SSZ (5 μ M), da soli o in combinazione con Etoposide per 2 settimane (A) o 5 settimane (B). I grafici relativi alle 2 e alle 5 settimane mostrano i consumi di glucosio (ordinata) che vengono registrati dopo ogni trattamento (ascissa) rispetto al controllo. I dati sono riportati come media $\pm$ S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. [#] $p < 0.05$ vs CSC HTLA-ER + Etoposide; ^{**} $p < 0.01$ vs CSC HTLA-230 Ctr o vs CSC HTLA-ER Ctr; ^{##} $p < 0.01$ vs CSC HTLA-ER+Etoposide.

7.10 Il trattamento con Etoposide per 2 settimane induce perossidazione lipidica nelle CSC delle HTLA-230 e tale evento è indotto nelle CSC (HTLA-ER) in presenza del trattamento combinato di Etoposide e SSZ o di Etoposide e C 2-4.

Come è possibile osservare nella Fig. 28 A, il trattamento per 2 settimane con Etoposide da sola o in combinazione con C 2-4 o SSZ induceva nelle CSC delle HTLA-230 un incremento dei livelli di MDA, noto indice di perossidazione lipidica. Occorre considerare che i trattamenti singoli con C 2-4 o SSZ aumentavano i livelli di MDA del 37% e del 115% rispetto alle popolazioni non trattate.

L'analisi dei livelli di MDA nelle CSC delle HTLA-ER, esposte agli stessi trattamenti per 2 e 5 settimane, ha dimostrato che in tali cellule l'Etoposide non induceva aumento di MDA (Fig. 28 A e B) e, quindi, perossidazione lipidica. Quando le neurosfere di cellule resistenti all'Etoposide (HTLA-ER) erano trattate per 2 e 5 settimane con SSZ da sola o in combinazione con l'Etoposide, si registrava un aumento significativo dei livelli di MDA rispetto alle cellule non trattate o trattate con sola Etoposide. Sulla base di tali dati, si evince che la SSZ, già dopo 2 settimane di trattamenti, è efficace nell'indurre perossidazione lipidica nelle CSC derivate dalle HTLA-ER.

Inoltre dopo 5 settimane, anche il co-trattamento di Etoposide e C 2-4 aumentava del 25% la produzione di MDA nelle CSC delle HTLA-ER rispetto alle stesse cellule trattate con Etoposide (Fig. 28 B).

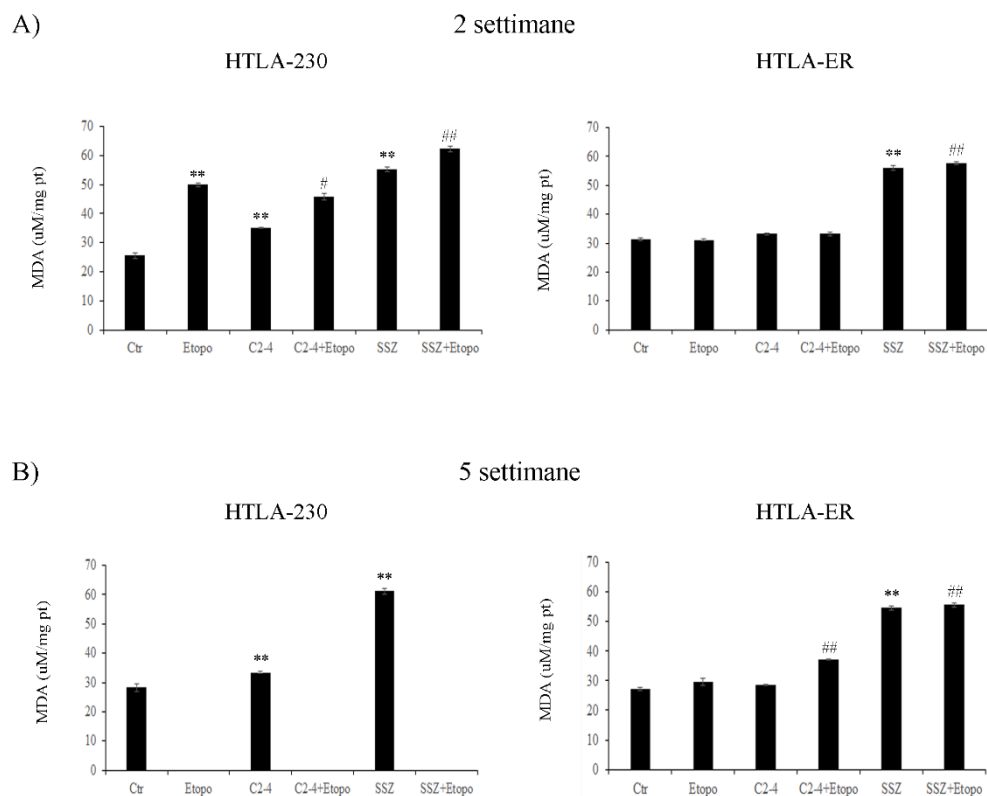


Figura 28. Livelli di malondialdeide (MDA) nelle CSC originate dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER trattate con Etoposide e/o inibitori per 2 e 5 settimane.

Le CSC derivate dalle HTLA-230 e quelle derivate dalle HTLA-ER sono state sottoposte ai trattamenti con Etoposide (1.25 μ M), C 2-4 (0.1 μ M) o SSZ (5 μ M), da soli o in combinazione con Etoposide per 2 settimane (A) o 5 settimane (B). I grafici relativi alle 2 e alle 5 settimane mostrano la produzione di MDA (ordinata) che vengono registrati dopo ogni trattamento (ascissa) rispetto al controllo. I dati sono riportati come media $\pm$ S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. ** $p < 0.01$ vs CSC HTLA-230 Ctr o vs CSC HTLA-ER Ctr, # $p < 0.05$ vs CSC HTLA-230+Etoposide, ## $p < 0.01$ vs CSC HTLA-230+Etoposide o vs CSC HTLA-ER+Etoposide

7.11 Il trattamento per 5 settimane con Etoposide induce nelle CSC delle HTLA-ER una marcata riduzione dell'espressione della glutatione perossidasi-4.

Dal momento che nelle CSC ottenute dalle HTLA-ER i co-trattamenti con SSZ inducevano danno ossidativo (vedi dati MDA, Fig. 28) che in

letteratura è stato correlato all'espressione di glutatione perossidasi (Hangauer M.J., et al. 2017), si è proceduto all'analisi di tale parametro.

Come è possibile osservare dall'immunoblotting mostrato in Fig. 29, il trattamento con Etoposide induceva nelle CSC originate dalle HTLA-ER una riduzione dell'espressione di glutatione perossidasi-4 (Gpx4) pari al 46% rispetto alle cellule non trattate. Inoltre, mentre il co-trattamento C2-4 ed Etoposide, riportava i livelli di espressione di Gpx4 a valori paragonabili a quelli osservati nel controllo, nelle cellule co-trattate con SSZ ed Etoposide, tali livelli rimanevano simili a quelli osservati a seguito del trattamento con la sola Etoposide (Fig. 29).

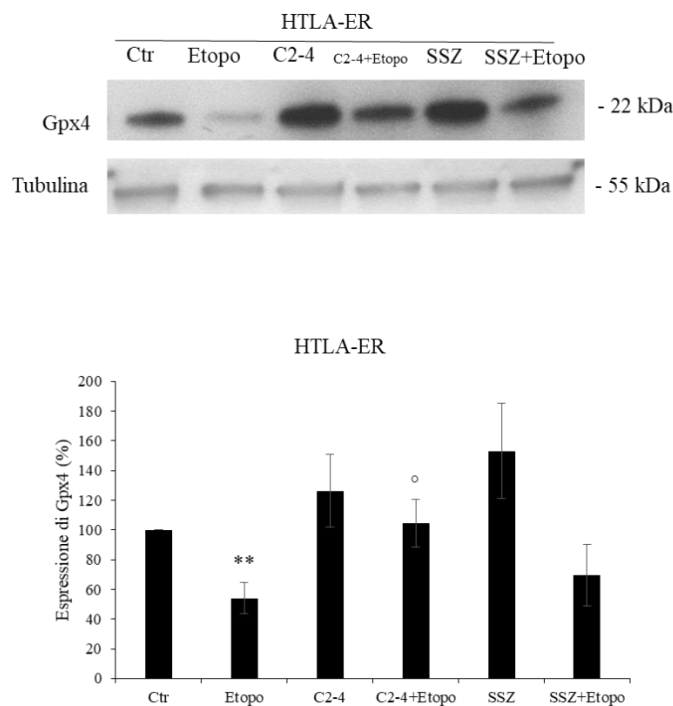


Figura 29. Livelli di espressione di Gpx4 nelle CSC dopo 5 settimane di trattamento.

Le CSC derivate dalle HTLA-230 e delle HTLA-ER sono state sottoposte ai trattamenti con Etoposide (1.25 μ M), C 2-4 (0.1 μ M) o SSZ (5 μ M), da soli o in combinazione con Etoposide per 5 settimane. I grafici relativi alle 5 settimane mostrano i livelli di proteina di Gpx4 normalizzati su tubulina totale espressi in percentuale (ordinata) dopo ogni trattamento (ascissa). I dati sono riportati come media $\pm$ S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. ** p <0.01 vs CSC HTLA-ER Ctr, ° p <0.05 vs CSC HTLA-ER+Etoposide.

8. DISCUSSIONE

Le terapie antitumorali ad oggi disponibili, pur essendo inizialmente efficaci nel ridurre la massa tumorale, inducono, a seguito del trattamento prolungato, la selezione di un ridotto numero di cellule che divengono estremamente resistenti e che sono responsabili dello sviluppo di recidive. La chemioresistenza può essere di due tipologie: 1) intrinseca, che è una proprietà innata delle cellule neoplastiche che possiedono la capacità di sfuggire agli effetti della chemioterapia (Wilson T.R., et al. 2006) e 2) estrinseca che viene acquisita da un gruppo di cellule in seguito a successive mutazioni genetiche ed epigenetiche che insorgono durante i trattamenti farmacologici (Alisi et al.). Tra i principali meccanismi implicati nella chemioresistenza sono stati descritti : i) alterazioni della funzionalità di pompe di membrana in grado di trasportare al di fuori della cellula il chemioterapico, ii) attivazione di oncogeni, iii) soppressione di oncosoppressori e iv) capacità di mantenere livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in concentrazioni moderate. Quest'ultima caratteristica permette alle cellule non solo di preservare dal danno ossidativo le macromolecole biologiche, ma anche, e soprattutto, di utilizzare i ROS quali secondi messaggeri capaci di modulare vie di trasduzione del segnale implicate nella sopravvivenza, proliferazione e morte cellulare (Marengo B., et al. 2016). A questo riguardo l'identificazione dei mediatori chiave di tale processo potrebbe consentire il monitoraggio della chemioresistenza ed anche la messa a punto di terapie mirate.

D'altro canto però, è stato anche riportato che l'insuccesso terapeutico legato alla resistenza può essere dovuto alla presenza, all'interno della popolazione cellulare, di cellule staminali del cancro (CSC) altamente maligne e resistenti, dotate di caratteristiche biologiche analoghe a quelle delle normali cellule staminali e che sono implicate nella formazione e nella progressione della neoplasia (Zhao J., 2016). A tale riguardo, è stato dimostrato che le CSC sono in grado di sopravvivere ai trattamenti antitumorali attraverso la modulazione, mediata dalla PKC α (Nagano O., et

al. 2004), dell'espressione di CD44, un marcatore di staminalità (Zöller M., 2011; Naor D., et al. 1997) ampiamente espresso in diversi tumori, tra cui il carcinoma mammario (Al-Hajj M., et al. 2003), il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (Prince M.E., et al. 2007) ed il neuroblastoma (Wei J.S., et al. 2004).

Inoltre, è stato dimostrato che la variante 9 (CD44v9) è capace di interagire con xCT e di stabilizzare tale proteina in membrana (Hagiwara M., et al. 2018). xCT è uno scambiatore di cistina-glutammato che agisce promuovendo l'*uptake* di cistina, aminoacido essenziale per la sintesi di glutathione (GSH), l'antiossidante maggiormente coinvolto nel mantenimento dell'equilibrio redox intracellulare (Traverso N., et al. 2013; Meister A., et al. 1983; Sies H., 1999). Sulle basi di tali evidenze, lo scopo principale di questa tesi di Dottorato è stato quello di modulare lo stato redox intracellulare alterando i livelli di GSH nelle cellule staminali del cancro al fine di aumentare la loro suscettibilità al trattamento farmacologico.

Come modello cellulare è stata utilizzata una linea di cellule di neuroblastoma umano, HTLA-230, concessa gentilmente dall'Istituto G. Gaslini di Genova. Da queste cellule trattate per 6 mesi con dosi crescenti di Etoposide è stata ottenuta una linea resistente al farmaco (HTLA-ER). Inizialmente, questo progetto di tesi si è focalizzato sull'allestimento e preparazione di neurosfere ottenute dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER.

In base ai risultati ottenuti mediante analisi citofluorimetrica, è stato confermato che le neurosfere selezionate dalle due popolazioni sono rappresentate da cellule staminali del cancro (CSC) in quanto entrambe esprimono Oct3/4, noto marker di staminalità (Jordan C.T., et al. 2006). Questi dati sono in accordo con studi che dimostrano l'implicazione di Oct3/4 nella regolazione della trascrizione di geni coinvolti nel mantenimento dello stato pluripotente indifferenziato (Lee J., et al. 2006).

Inoltre, diversi studi riportano che l'Etoposide, un chemioterapico largamente utilizzato in clinica (Simon T., et al. 2007; Haupt R. et al. 1997), esplica la sua azione citotossica incrementando la produzione di ROS

(Sordet O., et al. 2004) e che le cellule tumorali si adattano all'ambiente ossidante indotto dal farmaco, aumentando i livelli di antiossidanti cellulari ed in particolare di GSH (Trachootham D., et al. 2009). In tale ambito, un nostro recente studio (Colla et al.) ha dimostrato che il GSH gioca un ruolo cruciale nell'acquisizione della resistenza di cellule di neuroblastoma umano trattate a lungo termine con Etoposide. Tale coinvolgimento del GSH nell'acquisizione della chemioresistenza è ampiamente sostenuto da studi condotti utilizzando la Butionina sulfossimina (BSO), una sostanza capace di depletare il GSH attraverso l'inibizione della γ -glutamyl-cisteinyl ligasi, enzima chiave della sintesi del tripeptide (Griffith O.W., 1982). Tale composto, pur dimostrando la sua efficacia *in vitro* (Marengo B., et al. 2011a; Marengo B., et al. 2008; Domenicotti C., et al. 2003) ed *in vivo* (Fath M.A., et al. 2011; Rocha C.R., et al. 2014), non è utilizzabile nei pazienti perchè non è stabile e può sviluppare tossicità. Per questo motivo, è fondamentale mettere a punto strategie alternative che, riducendo i livelli di GSH, risultino efficaci nell'aumentare la sensibilità ai chemioterapici senza determinare effetti sistemici.

A tale fine, il secondo obiettivo di questo progetto di dottorato è stato quello di trattare le CSC, selezionate dalle HTLA-230 e dalle HTLA-ER, con Sulfasalazina (SSZ), un inibitore di xCT, o con C 2-4, un inibitore peptidico della PKC α . E' importante sottolineare che è stata valutata, mediante analisi citofluorimetrica, l'espressione di xCT e CD44 su entrambe le popolazioni, giustificando l'utilizzo di SSZ, che inibisce l'attività di xCT (Nagane M., et al. 2018) e di C2-4 che inibendo la PKC α , modula indirettamente l'espressione di CD44 (Ron et al.).

La SSZ è un farmaco antinfiammatorio e antimicrobico (Gadangi P., et al. 1996; Wahl C., et al. 1998) che, inibendo xCT e limitando l'ingresso di cistina, riduce i livelli di GSH (Zhang H., et al. 2012). Tale composto si è dimostrato efficace nel contrastare lo sviluppo del cancro pancreatico umano e la crescita delle cellule di leucemia linfocitica (Gout P.W., et al. 2001) e di neuroblastoma (Yco L.P., et al. 2015).

Per ciò che riguarda l'altro composto utilizzato, il C 2-4 è un inibitore peptidico che agisce inibendo la traslocazione in membrana della PKC α , ostacolandone l'attività funzionale (Ron D., et al. 1995). L'efficacia di tale inibitore in ambito terapeutico non è mai stata testata, ma studi condotti utilizzando un oligonucleotide antisense della PKC α , l'Aprinocarsen, hanno dimostrato la non tossicità del trattamento (Grossman S.A., et al. 2005; Advani R., et al. 2005; Advani R., et al. 2004; Ritch P., et al. 2006).

Dall'analisi della propagazione delle CSC è stato osservato che il trattamento con Etoposide, dopo due settimane, è in grado di inibire totalmente la formazione di CSC dalle HTLA-230, mentre un effetto analogo si osserva nelle HTLA-ER dopo 5 settimane.

Inoltre, il trattamento singolo con Etoposide depleta il GSH in entrambe le popolazioni di CSC, sensibili e resistenti al farmaco, ma con una diversa tempistica: le CSC sensibili rispondono già dopo 2 settimane mentre le CSC resistenti dopo 5 settimane. E' da notare che il co-trattamento con i 2 inibitori, SSZ o C 2-4, esercita un effetto sensibilizzante al farmaco nelle CSC resistenti anticipando l'azione antiproliferativa dell'Etoposide e la deplezione di GSH. In linea con questo dato, è stato riportato in letteratura che la SSZ reprime la crescita tumorale CD44v9-dipendente, aumentando la sensibilità ai farmaci citotossici (Takayama T., et al. 2016; Shitara K., et al. 2017 a,b).

I risultati ottenuti dimostrano che il mantenimento di elevati livelli di GSH è necessario per il mantenimento della chemioresistenza ed è fondamentale per lo sviluppo di CSC. Infatti, gli elevati livelli di GSH intracellulare delle CSC, resistenti permettono loro di risentire tardivamente, rispetto alle CSC sensibili, degli effetti citotossici dell'Etoposide. Inoltre, le CSC resistenti sono meno suscettibili al calo del GSH rispetto a quelle sensibili. Tali evidenze confermano il fondamentale ruolo che il GSH gioca nella genesi e mantenimento delle CSC ed è in accordo con un recente lavoro in cui è stato osservato che il trattamento con chemioterapici facilita la formazione di CSC nel cancro della mammella attraverso un incremento dei livelli intracellulari di GSH (Miran T., et al. 2018).

Inoltre, è importante evidenziare che la deplezione dei livelli di GSH, osservata nelle CSC resistenti dopo cinque settimane di trattamento con Etoposide, somministrata da sola o in combinazione con gli inibitori, è accompagnata da un incremento dei livelli di cisteina. La maggiore disponibilità di cisteina potrebbe essere dovuta ad un minore consumo dell'aminoacido non più impiegato per la sintesi del GSH.

Dal momento che il contenuto di GSH e la proliferazione sono strettamente dipendenti dal metabolismo, sono stati valutati alcuni parametri importanti quali il consumo di O₂, la produzione di ATP, il consumo di glucosio ed il rilascio di acido lattico. E' importante notare che le alterazioni metaboliche indotte dall'Etoposide nelle CSC sensibili (dopo 2 settimane), si manifestano nelle CSC resistenti più tardivamente (5 settimane) e solo in presenza dei co-trattamenti con SSZ o C2-4.

Dall'analisi di questi dati si evince che la refrattarietà al chemioterapico delle CSC resistenti è dovuta alla capacità di queste cellule di mantenere un efficiente metabolismo aerobio ed adeguati livelli di GSH durante il trattamento a lungo termine con il chemioterapico. Interessante evidenza è che la combinazione dell'Etoposide con SSZ o C2-4 è in grado di indurre uno *switch* verso un metabolismo anaerobio con il conseguente aumento del rilascio di acido lattico e l'induzione di perossidazione lipidica, eventi responsabili del danno di membrana e della morte delle cellule tumorali (Hangauer M.J., et al. 2017).

Sulla base di questi risultati inerenti il metabolismo, la SSZ agisce come agente disaccoppiante a livello mitocondriale e, dal momento che inibisce l'attività di xCT (Lo M., et al. 2010), è in grado di causare uno squilibrio dello stato redox intracellulare ostacolando la "rigenerazione" del GSH, tampone antiossidante e fattore pro-sopravvivenza per le cellule tumorali.

A tale riguardo, è stato dimostrato che l'acquisizione della chemioresistenza è associata alla capacità delle cellule di mantenere un efficiente metabolismo mitocondriale (Oliva C.R., et al. 2011) che è capace di favorire la sopravvivenza delle cellule neoplastiche adattandole all'azione citotossica del chemioterapico.

Inoltre, la riduzione dei livelli di GSH, gli alti livelli di perossidazione lipidica e la riduzione della propagazione cellulare, osservati nelle CSC resistenti dopo cinque settimane di trattamento con Etoposide da solo o in combinazione con SSZ potrebbe essere riconducibile al fenomeno della *ferroptosi*, un tipo di morte cellulare importante per le cellule tumorali chemioresistenti e che può essere associata ad una riduzione dei livelli di glutatione perossidasi GPx4 (Hangauer M.J., et al. 2017). A sostegno di tale ipotesi, è stato valutato il livello di espressione della GPx4 e si è osservato che subiva una riduzione nelle CSC trattate con Etoposide o co-trattate con SSZ.

Quindi, è ragionevole pensare che il mantenimento dei livelli di GSH, con l'attivazione di enzimi da esso dipendenti (Colla R., et al. 2016) ed un efficiente metabolismo mitocondriale siano cruciali per garantire la sopravvivenza delle cellule tumorali. Studiare in maniera approfondita i meccanismi molecolari che sottendono tale fenomeno potrebbe essere indispensabile al fine di aumentare la suscettibilità delle cellule staminali del cancro all'effetto del chemioterapico.

Invece, per quanto riguarda l'inibitore di PKC α , rimane da chiarire il meccanismo di azione riguardo la regolazione CD44-xCT, un bersaglio interessante da contrastare perchè potenzialmente coinvolto nelle strategie di sopravvivenza delle cellule staminali del cancro.

9. CONCLUSIONI

L'insuccesso terapeutico a cui vanno incontro molti pazienti oncologici è il risultato di molteplici eventi che portano alla selezione di cellule tumorali altamente resistenti all'azione citotossica dei chemioterapici. Tra queste cellule tumorali refrattarie alla terapia giocano un ruolo cruciale le cellule staminali del cancro (CSC). Diversi sono i meccanismi molecolari responsabili dell'elevata chemioresistenza delle CSC e, tra questi, la capacità di contrastare l'azione pro-ossidante dei chemioterapici è fondamentale per garantire la sopravvivenza cellulare. Pertanto, il riuscire a contrastare l'adattamento cellulare responsabile di tale evento è fondamentale al fine di inibire, o comunque limitare, la chemioresistenza.

In tale ambito, i risultati presentati in tale Tesi dimostrano che l'elevata quantità di GSH intracellulare e la capacità di mantenere un efficiente metabolismo mitocondriale consentono alle CSC chemioresistenti di risentire solo marginalmente dell'effetto dell'etoposide, chemioterapico che esplica la sua azione citotossica incrementando la produzione di specie reattive dell'ossigeno. Inoltre, tale studio suggerisce che xCT e CD44v9, proteine di membrana direttamente ed indirettamente implicate nel modulare i livelli intracellulari di GSH ed il metabolismo ossidativo, possono essere due bersagli molecolari verso cui sviluppare farmaci specifici che potranno essere di ausilio alla maggior parte dei regimi terapeutici correntemente utilizzati. Infatti, l'uso di terapie combinate, che prevedono la somministrazione di classici chemioterapici associata con l'utilizzo di chemio-sensibilizzanti, è un approccio sempre più utilizzato in ambito clinico. In tale contesto, farmaci capaci di modulare l'attività e/o l'espressione di xCT e CD44v9 non solo potrebbero essere efficaci nel sensibilizzare il tumore all'azione citotossica dei chemioterapici ma anche nel ridurre il dosaggio del chemioterapico stesso riducendone quindi gli effetti secondari negativi.

8. BIBLIOGRAFIA

Abdullah L.N., Chow E.K. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin. Transl. Med.* 2: 3; 2013.

Abu D.R., Schreiber K., Schomburg D., Adjaye J. Human embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells have overlapping and distinct metabolic signatures. *PLoS One* 7: e39896; 2012.

Advani R., Lum B.L., Fisher G.A., et al. A phase I trial of aprinocarsen (ISIS 3521/LY900003), an antisense inhibitor of protein kinase C- α administered as a 24-hour weekly infusion schedule in patients with advanced cancer. *Invest. New Drugs.* 23: 467-77; 2005.

Advani R., Peethambaram P., Lum B.L., et al. A Phase II trial of aprinocarsen, an antisense oligonucleotide inhibitor of protein kinase C α , administered as a 21-day infusion to patients with advanced ovarian carcinoma. *Cancer.* 15;100: 321-6; 2004.

Aggarwal B.B., Vijayalekshmi R.V., Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin. Cancer Res.* 15: 425–430; 2009.

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

Alisi A., Cho W.C., Locatelli F., Fruci D. Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* 14; 24706-25; 2013.

Anderson C.P., Tsai J.M., Meek W.E., et al. Depletion of glutathione by buthionine sulfoximine is cytotoxic for human neuroblastoma cell lines via apoptosis. *Experimental Cell Research* 246: 183–192; 1999.

Asensi M., Sastre J., Pallardo F.V., et al. Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. *Methods Enzymol.* 299: 267-76; 1999.

Azadkhan A.K., Truelove S.C., Aronson J.K. The disposition and metabolism of sulphasalazine (salicylazosulphapyridine) in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 13: 523-8; 1982.

Badwin E.L., Osheroff N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5: 363-372; 2005.

Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 120: 483-495; 2005.

Barata J.T., Silva A., Brandao J.G., et al. Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Exp. Med.* 6; 200: 659-69; 2004.

Batist G., Tulpule A., Sinha B.K. Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 261: 15544–15549; 1986.

Bedard K., Krause K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87: 245-313; 2007.

Berger J.M. Type II DNA topoisomerases. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 8: 26-32; 1998.

Besson A., Yong V.W. Involvement of p21Waf1/Cip1 in protein kinase C alpha induced cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4580-4590; 2000.

Bianchi G., Martella R., Ravera S., et al. Fasting induces anti-Warburg effect that increases respiration but reduces ATP-synthesis to promote apoptosis in colon cancer models. *Oncotarget.* 6: 11806-19; 2015.

Binder V., Bonnevie O., Folkenborg O., et al. The prophylactic effect of salazosulfapyridine in ulcerative colitis after a period of one year without symptoms on long-term treatment. A double-blind investigation. *Ugeskr Laeger.* 2; 134: 2093-5; 1972.

Boesch M., Zeimet A.G., Reimer D., et al. The side population of ovarian cancer cells defines a heterogeneous compartment exhibiting stem cell characteristics. *Oncotarget.* 30; 5: 7027-39; 2014.

Boman B.M., Wicha M.S., Fields J.Z., Runquist O.A. Symmetric division of cancer stem cells--a key mechanism in tumor growth that should be targeted in future therapeutic approaches. *Clin. Pharmacol. Ther.* 81: 893-8; 2007.

Bornancin F., Parker P.J. Phosphorylation of protein kinase C- α on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J Biol. Chem.* 272: 3544-3549; 1999.

Borovski T., Beke P., van Tellingen O., et al. Therapy-resistant tumor microvascular endothelial cells contribute to treatment failure in glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 21; 32: 1539-48; 2013.

Brandon M., Baldi P., Wallace D.C. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*. 25: 4647–4662; 2006.

Brasseur K., Gèury N., Asselinf E. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. *Oncotarget* 8: 4008-4042; 2017.

Brigelius-Flohe R. Tissue specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 951-965;1999.

Brunelle J.K., Bell E.L., Quesada N.M., et al. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 1: 409-14; 2005.

Bush J.A, Li G. Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters. *Int. J. Cancer.* 20; 98: 323-30; 2002.

Calabrese C., Poppleton H., Kocak M., et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 11: 69-82; 2007.

Calvert P., Yao K.S., Hamilton T.C., O'Dwyer P.J. Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione. *Chemico-Biological Interactions* 111-112: 213–224; 1998.

Cardenas C., Montagna M.K., Pitruzzello M., et al. Adipocyte microenvironment promotes Bcl(xl) expression and confers chemoresistance in ovarian cancer cells. *Apoptosis.* 22: 558-569; 2017.

Carretero J., Obrador E., Anasagasti M.J., et al. Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 17: 567–574; 1999.

Champoux J.J. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 369-413; 2001.

Chang F.W., Fan H.C., Liu J.M., et al. Estrogen Enhances the Expression of the Multidrug Transporter Gene ABCG2-Increasing Drug Resistance of Breast Cancer Cells through Estrogen Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* 14; 18; 2017.

Chen C.L., Uthaya Kumar D.B., Punj V., et al. NANOG Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab.* 12; 23: 206-19; 2016.

Chen C.T., Shih Y.R., Kuo T.K., et al. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic

differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 26: 960-8; 2008.

Chen E.I., Hewel J., Krueger J.S., et al. Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases. *Cancer Res*. 15; 67: 1472-86; 2007.

Chen R.S., Song Y.M., Zhou Z.Y. et al. Disruption of xCT inhibits cancer cell metastasis via the caveolin-1/beta-catenin pathway. *Oncogene*. 28: 599-609; 2009.

Cheung T.H., Rando T.A. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 14: 329-40; 2013.

Chung W.J., Sontheimer H. Sulfasalazine inhibits the growth of primary brain tumors independent of nuclear factor-kappaB. *J. Neurochem*. 110: 182-93; 2009.

Cioffi M., D'Alterio C., Camerlingo R., et al. Identification of a distinct population of CD133(+) CXCR4(+) cancer stem cells in ovarian cancer. *Sci. Rep.* 28; 5: 10357; 2015.

Clark P.I., Slevin M.L. The clinical pharmacology of etoposide and teniposide. *Clin. Pharmacokinet.* 12: 223-252; 1987.

Cole S.P., Bhardwaj G., Gerlach J.H., et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 4; 258: 1650-4; 1992.

Colla R., Izzotti A., De Ciucis C., et al. Glutathione-mediated antioxidant response and aerobic metabolism: two crucial factors involved in determining the multi-drug resistance of high-risk neuroblastoma. *Oncotarget*. 25; 7: 70715-70737; 2016.

Collins A.T., Berry P.A., Hyde C., et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 65: 10946-10951; 2005.

Conklin K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr. Cancer Ther.* 3: 294-300; 2004.

Corbett K.D., Berger J.M. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Bioph. Biom.* 33: 95-118; 2004.

Cowan K.H., Batist G., Tulpule A. Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 9328–9332; 1986.

Culotta V.C., Yang M., O'Halloran T.V. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763: 747-58; 2006.

Curi R., Newsholme P., Newsholme E.A. Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. *Biochem. J.* 1; 250: 383-8; 1988.

Curtin J.C., Lorenzi M.V. Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stem cells. *Oncotarget.* 1: 552–566; 2010.

D'Alessio M., Cerella C., Amici C. et al. Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO-resistant cells. *The FASEB Journal* 18: 1609–1611; 2004.

Dawood S., Austin L., Cristofanilli M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park);* 28: 1101-7, 1110; 2014.

Dean N., Mckay R., Miraglia L. et al. Inhibition of growth of human tumor cell lines in nude mice by an antisense oligonucleotide inhibitor of protein kinase C- α expression. *Cancer Res.* 56: 3499-3507; 1996.

DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C-B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 7: 11-20; 2008.

Dempsey E.C., Newton A.C., Mochly-Rosen D., et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L429-38; 2000.

DeNicola G.M., Karreth F.A., Humpton T.J., et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature.* 6; 475: 106-9; 2011.

DeVita V.T. Jr, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 1; 68: 8643-53; 2008.

Diaz A., Leon K. Therapeutic Approaches to Target Cancer Stem Cells. *Cancers.* 3: 3331-3352; 2011.

Diehn M., Cho R.W., Lobo N.A., et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature,* 458: 780–783; 2009.

Domenicotti C., Marengo B., Verzola D., et al. Role of PKC-delta activity in glutathione-depleted neuroblastoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1; 35: 504-16; 2003.

Domingo-Domenech J., Vidal S.J., Rodriguez-Bravo V., et al. Suppression of acquired docetaxel resistance in prostate cancer through depletion of notch- and hedgehog-dependent tumor-initiating cells. *Cancer Cell.* 11; 22: 373-88; 2012.

Dong C., Yuan T., Wu Y., et al. Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell.* 18; 23: 316-31; 2013.

Dong X., Wang Y., Zhou Y., et al. Aquaporin 3 facilitates chemoresistance in gastric cancer cells to cisplatin via autophagy. *Cell Death Discov.* 14; 2: 16087; 2016.

Dutil E.M., Newton A.C. Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 275: 10697-10701; 2000.

Elstrom R.L., Bauer D.E., Buzzai M., et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 1; 64: 3892-9; 2004.

Estrela J.M., Ortega A., Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 43: 143-81; 2006.

Fantin V.R., St-Pierre J., Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell.* 9: 425-34; 2006.

Fariss M.W., Reed D.J. High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Methods Enzymol.* 143: 101-9; 1987.

Fath M.A., Ahmad I.M., Smith C.J., Spence J., Spitz D.R. Enhancement of carboplatin-mediated lung cancer cell killing by simultaneous disruption of glutathione and thioredoxin metabolism. *Clin. Cancer Res.* 17: 6206-17; 2011.

Folmes C.D., Dzeja P.P., Nelson T.J., Terzic A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell.* 2; 11: 596-606; 2012.

Franco R., Schoneveld O.J., Pappa A., Panayiotidis M.I. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch. Physiol. Biochem.* 113: 234-58; 2007.

Frey M. R., Clark J. A., Leontieva O., et al. Protein kinase C signaling mediates a program of cell cycle withdrawal in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* 151: 763-777; 2000.

Fukai, T., Ushio-Fukai M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 15: 1583-1606; 2011.

Gabrielson M., Björklund M., Carlson J., Shoshan M. Expression of mitochondrial regulators PGC1 α and TFAM as putative markers of subtype and chemoresistance in epithelial ovarian carcinoma. *PLoS One.* 22; 9: e107109; 2014.

Gadangi P., Longaker M., Naime D., et al. The anti-inflammatory mechanism of sulfasalazine is related to adenosine release at inflamed sites. *J. Immunol.* 156: 1937-41; 1996.

Gao JX. Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* 12: 67-96; 2008.

Gatto B., Leo E. Drugs acting on the beta isoform of human topoisomerase II. *Curr. Med. Chem* 3:175-185; 2003.

Gipp J.J., Chang C., Mulcahy R.T. Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human liver gamma-glutamylcysteine synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29; 185: 29-35; 1992.

Gorrini C., Harris I. S., Mak T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Disc.* 12: 931–947; 2013.

Gout P.W., Buckley A.R., Simms C.R., Bruchovsky N. Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x(c)- cystine transporter: a new action for an old drug. *Leukemia.* 15: 1633-40; 2001.

Greco F.A., Hainsworth J.D. Clinical studies with etoposide phosphate. *Semin. Oncol.* 23: 45-50; 1996.

Gregory A.D., Houghton A.M. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 1; 71: 2411-6; 2011.

Grem J.L., Hoth D.F., Leyland-Jones B., et al. Teniposide in the treatment of leukemia: a case study of conflicting priorities in the development of drugs for fatal diseases. *J. Clin. Oncol.* 6: 351-379; 1988.

Griffith O.W. Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthioninesulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J. Biol. Chem.* 257: 13704–13712; 1982.

Grossman S.A., Alavi J.B., Supko J.G., et al. Efficacy and toxicity of the antisense oligonucleotide aprinocarsen directed against protein kinase C-

alpha delivered as a 21-day continuous intravenous infusion in patients with recurrent high-grade astrocytomas. *Neuro Oncol.* 7: 32-40; 2005.

Guan J., Lo M., Dockery P., et al. The xc- cystine/glutamate antiporter as a potential therapeutic target for small-cell lung cancer: use of sulfasalazine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64: 463-72; 2009.

Guerra F., Arbin A.A., Moro L. Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1858: 686-699; 2017.

Hagiwara M., Kikuchi E., Tanaka N., et al. Variant isoforms of CD44 involves acquisition of chemoresistance to cisplatin and has potential as a novel indicator for identifying a cisplatin-resistant population in urothelial cancer. *BMC Cancer.* 18: 113; 2018.

Hamilton D., Wu J.H., Batist G. Structure-based identification of novel human gamma-glutamylcysteine synthetase inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 71: 1140-7; 2007.

Han L., Hiratake J., Kamiyama A., Sakata K. Design, synthesis, and evaluation of γ -phosphonodiester analogues of glutamate as highly potent inhibitors and active site probes of γ -glutamyltranspeptidase. *Biochem.* 46: 1432–1447; 2007.

Han L., Zhu Y., Liu M., et al. Molecular mechanism of substrate recognition and transport by the AtSWEET13 sugar transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 19; 114: 10089-10094; 2017.

Hangauer M.J., Viswanathan V.S., Ryan M.J., et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature.* 551: 247-250; 2017.

Haupt R., Fears T.R., Heise A., et al. Risk of secondary leukemia after treatment with etoposide (VP-16) for Langerhans' cell histiocytosis in Italian and Austrian-German populations. *Int. J. Cancer.* 71: 9-13; 1997.

Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 51-88; 2005.

Hirschmann-Jax C., Foster A.E., Wulf G.G., et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 28; 101: 14228-33; 2004.

Hoang B., Zhu L., Shi Y., et al. Oncogenic RAS mutations in myeloma cells selectively induce cox-2 expression, which participates in enhanced adhesion to fibronectin and chemoresistance. *Blood.* 1; 107: 4484-90; 2006.

Hu J., Li G., Zhang P., Zhuang X., Hu G. A CD44v (+) subpopulation of breast cancer stem-like cells with enhanced lung metastasis capacity. *Cell Death Dis.* 16; 8: e2679; 2017.

Hu S.H., Wang C.H., Huang Z.J., et al. miR-760 mediates chemoresistance through inhibition of epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20: 5002–5008; 2016.

Huang S.C., Everts B., Ivanova Y. et al. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat. Immunol.* 15: 1–12; 2014.

Huang Y., Dai Z., Barbacioru C., Sadée W. Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.* 15; 65: 7446-54; 2005.

Huang Z.Z., Chen C., Zeng Z., et al. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *The FASEB Journal* 15: 19–21; 2001.

Iliopoulos D., Lindahl-Allen M., Polytarchou C., et al. Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells. *Mol. Cell.* 10; 39: 761-72; 2010.

Irani K., Xia Y., Zweier J.L., et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science.* 14; 275: 1649-52; 1997.

Ishimoto T., Nagano O., Yae T., et al. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc (-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell.* 8; 19: 387-400; 2011.

Islam M.O., Kanemura Y., Tajria J., et al. Functional expression of ABCG2 transporter in human neural stem/progenitor cells. *Neurosci. Res.* 52: 75-82; 2005.

Janssen-Heininger Y.M.W., Mossman B.T., Heintz N.H., et al. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic. Biol.Med.* 45: 1–17; 2008.

Ji X., Qian J., Rahman S.M.J., Siska P.J., et al. xCT (SLC7A11)-mediated metabolic reprogramming promotes non-small cell lung cancer progression. *Oncogene.* 37: 5007-5019; 2018.

Jihe Z. Cancer stem cells and chemoresistance: the smartest survives the raid. *Pharmacology & Therapeutics* 160: 145–158; 2016.

Jordan C.T., Guzman M.L., Noble M. Cancer stem cells. *N. Engl. J. Med.* 355: 1253-61; 2006.

Kaplowitz N. The importance and regulation of hepatic glutathione. *Yale J. Biol. Med.* 54: 497-502; 1981.

Karlsson J., Øra I., Pörn-Ares I., Pålman S. Arsenic trioxide-induced death of neuroblastoma cells involves activation of Bax and does not require p53. *Clin. Cancer Res.* 10: 3179-88; 2004.

Kawanishi S., Hiraku Y., Pinlaor S., Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol. Chem.* 387: 365–372; 2006.

Kocch W., Heidecker G., Kochs G., et al. Protein kinase C α activates Raf-1 by direct phosphorylation. *Nat.* 364: 249-252; 1993.

Kondoh H., Lleonart M.E., Bernard D., Gil J. Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization. *Histol. Histopathol.* 22: 85-90; 2007.

Kreger B.T., Johansen E.R., Cerione R.A., Antonyak M.A. The Enrichment of Survivin in Exosomes from Breast Cancer Cells Treated with Paclitaxel Promotes Cell Survival and Chemoresistance. *Cancers (Basel).* 9; 8; 2016.

Kuroda H., Takeno M., Murakami S., et al. Inhibition of heme oxygenase-1 with an epidermal growth factor receptor inhibitor and cisplatin decreases proliferation of lung cancer A549 cells. *Lung Cancer.* 67: 31-6; 2010.

Lane N., Martin W. The energetics of genome complexity. *Nat.* 467: 929–934; 2010.

Lang J.Y., Hsu J.L., Meric-Bernstam F., et al. BikDD eliminates breast cancer initiating cells and synergizes with lapatinib for breast cancer treatment. *Cancer Cell.* 13; 20: 341-56; 2011.

Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 17; 367: 645-8; 1994.

Lathia J.D., Liu H. Overview of Cancer Stem Cells and Stemness for Community Oncologists. *Target Oncol.* 12: 387-399; 2017.

Lau W.M., Teng E., Chong H.S., et al. CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells. *Cancer Res.* 74: 2630-2641; 2014.

Lecane P.S., Karaman M.W., Sirisawad M., et al. Motexafingadolium and zinc induce oxidative stress responses and apoptosis in B-cell lymphoma lines. *Cancer Res.* 65: 11676–11688; 2005.

Lee J., Kim H.K., Rho J.Y., Han Y.M., Kim J. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J. Biol. Chem.* 281: 33554-65; 2006.

Li J., Liu H., Yu J., Yu H. Chemoresistance to doxorubicin induces epithelial-mesenchymal transition via upregulation of transforming growth factor β signaling in HCT116 colon cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 12: 192–198; 2015.

Li S., Huang F. L., Feng Q., et al. Overexpression of protein kinase C α enhances lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation in vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 176: 402-411; 1998.

Li W., Melton D.W. Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance. *Oncogene* 31: 2412-22; 2012.

Liao H., Bai Y., Qiu S. et al. miR-203 downregulation is responsible for chemoresistance in human glioblastoma by promoting epithelial-mesenchymal transition via SNAI2. *Oncotarget* 6: 8914–8928; 2015.

Liu C., Kelnar K., Liu B., et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat. Med.* 17: 211-5; 2011.

Liu Q.H., Shi M.L., Sun C., Bai J., Zheng JN. Role of the ERK1/2 pathway in tumor chemoresistance and tumor therapy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15; 25: 192-7; 2015.

Liu S., Cong Y., Wang D., et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports.* 2: 78-91; 2013.

Liu S., Sun J., Cai B., et al. NANOG regulates epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance through activation of the STAT3 pathway in epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol.* 37: 9671–9680; 2016.

Lo M., Ling V., Low C., Wang Y.Z., Gout P.W. Potential use of the anti-inflammatory drug, sulfasalazine, for targeted therapy of pancreatic cancer. *Curr. Oncol.* 17: 9-16; 2010.

Lo M., Ling V., Wang Y.Z., Gout P.W. The xc- cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance. *Br. J. Cancer.* 5; 99: 464-72; 2008.

London R.E., Gabel S.A. Development and evaluation of a boronate inhibitor of γ -glutamyltranspeptidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 250–258; 2001.

Longley D.B., Johnston P.G. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 205: 275-292; 2005.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-75; 1951.

Lu C., Shervington A. Chemoresistance in gliomas. *Mol. Cell. Biochem.* 312: 71-80; 2008.

Lu D., Shi H.C., Wang Z.X., Gu X-W., Zeng Y.J. Multidrug resistance-associated biomarkers PGP, GST-pi, Topo-II and LRP as prognostic factors in primary ovarian carcinoma. *Br. J. Biomed. Sci.* 68: 69-74; 2011.

Lu H., Shi S., Gong T., Zhang Z., Sun X. Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharmac. Sinica B.* 3: 65-75; 2013.

Lu S.C. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 30: 42-59; 2009.

Lushchak V. I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Am. Ac.* 736837; 2012.

Ma M.Z., Chen G., Wang P., et al. Xc- inhibitor sulfasalazine sensitizes colorectal cancer to cisplatin by a GSH-dependent mechanism. *Cancer Lett.* 1; 368: 88-96; 2015.

Mandil R., Ashkenazi E., Blass M., et al. Protein kinase C α and protein kinase C δ play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells. *Cancer Res.* 61: 4612-4619; 2001.

Mani S.A., Guo W., Liao M.J., et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 16; 133: 704-15; 2008.

Marengo B., Ciucis C.D., Ricciarelli R., et al. DNA oxidative damage of neoplastic rat liver lesions. *Onc. Rep.* 23: 1241–1246; 2010.

Marengo B., De Ciucis C., Ricciarelli R., et al. PKC δ sensitizes neuroblastoma cells to L-buthionine-sulfoximine and etoposide inducing reactive oxygen species overproduction and DNA damage. *PLoS One.* 7; 6: e14661; 2011.

Marengo B., De Ciucis C., Ricciarelli R., et al. Protein kinase C: an attractive target for cancer therapy. *Cancers (Basel)*. 1; 3: 531-67; 2011.

Marengo B., De Ciucis C., Verzola D., et al. Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma. *Free Radic. Biol. Med.* 1; 44: 474-82; 2008.

Marengo B., Nitti M., Furfaro A.L., et al. Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Ox. Med. Cell. Long.* 6235641; 2016.

Marengo B., Raffaghello L., Pistoia V., et al. Reactive oxygen species: biological stimuli of neuroblastoma cell response. *Cancer Lett.* 18; 228: 111-6; 2005.

Marí M., Morales A., Colell A., et al. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid. Redox Signal.* 11: 2685-2700; 2009.

Marjanovic N.D., Weinberg R.A., Chaffer C.L. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin. Chem.* 59: 168-79; 2013.

Masciarelli S., Fontemaggi G., Di Agostino S., et al. Gain-of-function mutant p53 downregulates miR-223 contributing to chemoresistance of cultured tumor cells. *Oncogene*. 20; 33: 1601-8.; 2014.

Meacham C.E., Morrison S.J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 19; 501: 328-37; 2013.

Meister A. Glutathione metabolism. *Methods in Enzymology* 251: 3–7; 1995.

Meister A. On the discovery of glutathione. *Trends Biochem. Sci.* 13: 185-8; 1988.

Meister A., Anderson M.E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 711-60; 1983.

Miao L., St Clair D.K. Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Disease. *Free Radic. Biol. Med.* 47: 344-356; 2009.

Miran T., Vogg A.T.J., Drude N., Mottaghy F.M., Morgenroth A. Modulation of glutathione promotes apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *FASEB J.* 32: 2803-2813; 2018.

Molofsky A.V., Pardal R., Morrison S.J. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16: 700-7; 2004.

Moreno-Sánchez R., Rodríguez-Enríquez S., Marín-Hernández A., Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274: 1393-418; 2007.

Nagane M., Kanai E., Shibata Y., et al. Sulfasalazine, an inhibitor of the cystine-glutamate antiporter, reduces DNA damage repair and enhances radiosensitivity in murine B16F10 melanoma. *PLoS One.* 13: e0195151; 2018.

Nagano O., Murakami D., Hartmann D., et al. Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca (2+) influx and PKC activation. *J. Cell. Biol.* 21; 165: 893-902; 2004.

Nagano O., Okazaki S., Saya H. Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. *Oncogene.* 31; 32: 5191-8; 2013.

Nagel Z.D., Kitange G.J., Gupta S.K., et al. DNA Repair Capacity in Multiple Pathways Predicts Chemoresistance in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Res.* 1; 77: 198-206; 2017.

Nakajima E.C., Van Houten B. Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. *Mol. Carcinog.* 52: 329-37; 2013.

Naor D., Sionov R.V., Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv. Cancer Res.* 71: 241–319; 1997.

Navarro A., Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkinson's disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41: 517-521; 2009.

Nemunaitis J., Holmlund J.T., Kraynak M., et al. Phase I evaluation of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C- α , in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 17: 3586-95; 1999.

Neradil J., Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci.* 106: 803-11; 2015.

Neuzil J., Weber T., Schröder A. et al. Induction of cancer cell apoptosis by α -tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements. *FASEB J.* 15: 403-415; 2001.

Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614; 1992.

Nitiss J.L. DNA topoisomerases II and its growing repertoire of biological functions. *Nat. Rev. Cancer* 9: 327-337; 2009.

Nitiss J.L. Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1400: 63-81; 1998.

O'Brien M. L., Tew K. D. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Euro. J. of Cancer A.* 32: 967–978; 1996.

O'Dwyer P. J., Hamilton T.C., La Creta F. P. et al. Phase I trial of buthioninesulfoximine in combination with melphalan in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* 14: 249–256; 1996.

Ohata H., Ishiguro T., Aihara Y., et al. Induction of the stem-like cell regulator CD44 by Rho kinase inhibition contributes to the maintenance of colon cancer-initiating cells. *Cancer Res.* 1; 72: 5101-10; 2012.

Oja S.S., Janáky R., Varga V., Saransaari P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochem. Int.* 37: 299-306; 2000.

Ojha R., Bhattacharyya S., Singh S.K. Autophagy in cancer stem cells: a potential link between chemoresistance, recurrence, and metastasis. *Biores. Open Access* 4: 97-108; 2015.

Oliva C.R., Moellering D.R., Gillespie G.Y., Griguer CE. Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production. *PLoS One.* 6: e24665; 2011.

Oppenheimer L., Wellner V.P., Griffith O.W., Meister A. Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites. *J. Biol. Chem.* 25; 254: 5184-90; 1979.

O'Rourke J.F., Pugh C.W., Bartlett S.M., Ratcliffe P.J. Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1. *Eur. J. Biochem.* 15; 241: 403-10; 1996.

Osthus R.C., Shim H., Kim S., et al. Dereglulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 21; 275: 21797-800; 2000.

Ozawa K., Szallasi Z., Kazanietz M. G., et al. Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 1749-1756; 1993.

Pacini N., Borziani F. Cancer stem cell theory and the warburg effect, two sides of the same coin? *Int. J. Mol. Sci.* 19; 15: 8893-930; 2014.

Page C., Lin H.J., Jin Y., et al. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res.* 20: 407-16; 2000.

Pervaiz S., Clement M.V. Tumor intracellular redox status and drug resistance — serendipity or a causal relationship? *Curr. Pharm. Des.* 10: 1969–1977; 2004.

Petros W.P., Rodman J.H., Relling M.V., et al. Variability in teniposide plasma protein binding is correlated with serum albumin concentrations. *Pharmacotherapy* 12: 273-277; 1992.

Pfeifer G.P. p53 mutational spectra and the role of methylated CpG sequences. *Mutat. Res.* 30: 450: 155-66; 2000.

Pierce A., Heyworth C.M., Nicholls S.E., et al. An activated protein kinase C α gives a differentiation signal for hematopoietic progenitor cells and mimics macrophage colony-stimulating factor-stimulated signal events. *J. Cell Biol.* 140: 1511-1518; 1998.

Pommier Y., Sun Y., Huang S., Nitiss J.L. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17: 703-721; 2016.

Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A.F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 15; 66: 1499-503; 2003.

Ponta H., Sherman L., Herrlich P.A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 33-45; 2003.

Powers S.K., Jackson M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force reduction. *Physiol. Res.* 88: 1243-1276; 2008.

Prince M.E., Sivanandan R., Kaczorowski A., et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 973-8; 2007.

Ramsay E.E., Dilda P.J. Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. *Front. Pharmacol.* 11; 5: 181; 2014.

Ravera S., Bartolucci M., Cuccarolo P., et al. Oxidative stress in myelin sheath: The other face of the extramitochondrial oxidative phosphorylation ability. *Free Radic. Res.* 49: 1156-64; 2015.

Reber U., Wüllner U., Trepel M., et al. Potentiation of treosulfantoxicity by the glutathione-depleting agent buthioninesulfoximine in human malignant glioma cells. The role of BCL-2. *Biochem. Pharmacol.* 55: 349–359; 1998.

Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 1; 414: 105-11; 2001.

Richman P.G., Meister A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* 25; 250: 1422-6; 1975.

Ritch P., Rudin C.M., Bitran J.D., et al. Phase II study of PKC-alpha antisense oligonucleotide aprinocarsen in combination with gemcitabine and carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 52: 173-80; 2006.

Rocha C.R., Garcia C.C., Vieira D.B., et al. Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* 5: e1505; 2014.

Rodrigues M.S., Reddy M.M., Sattler M. Cell cycle regulation by oncogenic tyrosine kinases in myeloid neoplasias: from molecular redox mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox Signal.* 10: 1813–1848; 2008.

Romanova I.Y., Alexandrov I.A., Nordin R.P., et al. Cross-talk between protein kinase C- α (PKC- α) and - δ (PKC- δ). *Biochem.* 37: 5558-5565; 1998.

Ron D., Luo J., Mochly-Rosen D. C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo. *J. Biol. Chem.* 270: 24180-7; 1995.

Rossi D.J., Jamieson C.H.M., Weissman I.L. Stems Cells and the Pathways to Aging and Cancer. *Cell*. 132: 681–696; 2008.

Ruvolo P.P., Deng X., Carr B.K., May, S. A functional role for mitochondrial protein kinase C α in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273: 25436-25442; 1998.

Samudio I., Harmancey R., Fiegl M., et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J. Clin. Invest.* 120: 142-56; 2010.

Sancho P., Barneda D., Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br. J. Cancer*. 14; 114: 1305-12; 2016.

Sasaki H., Sato H., Kuriyama-Matsumura K., et al. Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J. Biol. Chem.* 22; 277: 44765-71; 2002.

Sato H., Shiiya A., Kimata M., et al. Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 280: 37423-37429; 2005.

Sato H., Tamba M., Ishii T., Bannai S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate Exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.* 274: 11455-11458; 1999.

Schafer Z.T., Grassian A.R., Song L., et al. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature.* 3; 461: 109-13; 2009.

Schneider B.L., Kulesz-Martin M. Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 25: 2033–2044; 2004.

Schönwasser D.C., Marais R.M., Marshall C.J., Parker P.J. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell Biol.* 18: 790-8; 1998.

Sell S. On the stem cell origin of Cancer. *Am. J. Pathol.* 176: 2584-2594; 2010.

Sharom F.J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* 9: 105-27; 2008.

Shen J., Liu X., Yu W.M., et al. A critical role of mitochondrial phosphatase Ptpmt1 in embryogenesis reveals a mitochondrial metabolic stress-induced differentiation checkpoint in embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 31: 4902–4916; 2011.

Shen L., Dean N.M., Glazer R.I. Induction of p53-dependent, insulin-like growth factor-binding protein-3-mediated apoptosis in glioblastoma multiforme cells by a protein kinase C α antisense oligonucleotide. *Mol. Pharmacol.* 55: 396-402; 1999.

Shen Y.A., Lin C.H., Chi W.H., et al. Resveratrol Impedes the Stemness, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Metabolic Reprogramming of Cancer Stem Cells in Nasopharyngeal Carcinoma through p53 Activation. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 590393; 2013.

Shitara K., Doi T., Nagano O., et al. Dose-escalation study for the targeting of CD44v(+) cancer stem cells by sulfasalazine in patients with advanced gastric cancer (EPOC1205). *Gastric Cancer.* 20: 341-349; 2017.
(a)

Shitara K., Doi T., Nagano O., et al. Phase 1 study of sulfasalazine and cisplatin for patients with CD44v-positive gastric cancer refractory to cisplatin (EPOC1407). *Gastric Cancer*. 20: 1004-1009; 2017. (b)

Shteingauz A., Boyango I., Naroditsky I., et al. Heparanase Enhances Tumor Growth and Chemoresistance by Promoting Autophagy. *Cancer Res*. 15; 75: 3946-57; 2015.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* 27: 916–921; 1999.

Siggins R.W., Zhang P., Welsh D., Lecapitaine N.J., Nelson S. Stem cells, phenotypic inversion, and differentiation. *Int. J. Clin. Exp. Med*. 1: 2-21; 2008.

Simon T., Längler A., Harnischmacher U., et al. Topotecan, cyclophosphamide, and etoposide (TCE) in the treatment of high-risk neuroblastoma. Results of a phase-II trial. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 133: 653-61; 2007.

Slovak M.L., Ho J.P., Cole S.P., et al. The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. *Cancer Res*. 1; 55: 4214-9; 1995.

Snyder V., Reed-Newman T.C., Arnold L., Thomas S.M., Anant S. Cancer Stem Cell Metabolism and Potential Therapeutic Targets. *Front. Oncol*. 8: 203; 2018.

Sontheimer H., Bridges R.J. Sulfasalazine for brain cancer fits. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 21: 575-8; 2012.

Sordet O., Khan Q.A., Plo I., et al. Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by staurosporine-mediated oxygen radicals. *J. Biol. Chem*. 279: 50499-504; 2004.

Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 1; 414: 98-104; 2001.

Sullivan R., Graham C.H. Chemosensitization of cancer by nitric oxide. *Curr. Pharm. Des*. 14: 1113–1123; 2008.

Sun X., Rotenberg S.A. Overexpression of Protein kinase C α in MCF-10 human breast cancer cells engenders dramatic alterations in morphology, proliferation, and motility. *Cell Growth Differ* 10: 343-352; 1999.

Sun Y., Guan Z., Liang L., et al. NF- κ B signaling plays irreplaceable roles in cisplatin-induced bladder cancer chemoresistance and tumor progression. *Int. J. Oncol.* 48: 225-34; 2016.

Szatrowski T.P., Nathan C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 1; 51: 794-8; 1991.

Takayama T., Kubo T., Morikawa A., et al. Potential of sulfasalazine as a therapeutic sensitizer for CD44 splice variant 9-positive urogenital cancer. *Med. Oncol.* 33: 45; 2016.

Tanabe K.K., Ellis L.M., Saya H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* 34: 725-726; 1993.

Tang D.G. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res.* 22: 457-72; 2012.

Tate S. S., Meister A. Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of γ -glutamyltranspeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10: 4806–4809; 1978.

Thannickal V.J., Fanburg B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L1005-28; 2000.

Thottassery J.V., Zambetti G.P., Arimori K., Schuetz E.G., Schuetz J.D. p53-dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 30; 94: 11037-42; 1997.

Toma J.G., McKenzie I.A., Bagli D., Miller F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells.* 23: 727-37; 2005.

Toyokuni S., Okamoto K., Yodoi J., Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 358: 1–3; 1995.

Trachootham D., Lu W., Ogasawara M.A., Nilsa R.D., Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 10: 1343–1374; 2008. (a)

Trachootham D., Alexandre J., Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* 8: 579-91; 2009.

Trachootham D., Zhang H., Zhang W., et al. Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through a redox-mediated mechanism. *Blood.* 1; 112: 1912-22; 2008. (b)

Trachootham D., Zhou Y., Zhang H., et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell*. 10: 241-52; 2006.

Traverso N., Ricciarelli R., Nitti M., et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2013: 972913; 2013.

Vallentin A., Prevostel C., Fauquier T., et al. Membrane targeting and cytoplasmic sequestration in the spatiotemporal localization of human protein kinase C α . *J. Biol. Chem*. 275: 6014-6021; 2000.

Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 324: 1029–33; 2009.

Verga Falzacappa M.V., Ronchini C., Reavie L.B., Pelicci P.G. Regulation of self-renewal in normal and cancer stem cells. *FEBS J*. 279: 3559-3572; 2012.

Vidal S.J., Rodriguez-Bravo V., Galsky M., Cordon-Cardo C., Domingo-Domenech J. Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. *Oncogene*. 4; 33: 4451-63; 2014.

Wahl C., Liptay S., Adler G., Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J. Clin. Invest*. 101: 1163-74; 1998.

Wallace D.C. Mitochondria and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12: 685-698; 2012.

Walton J.D., Kattan D.R., Thomas S.K., et al. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia*. 6: 838-45; 2004.

Wang J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio*. 3: 430-440; 2002.

Wang L., Mosel A.J., Oakley G.G., Peng A. Deficient DNA damage signaling leads to chemoresistance to cisplatin in oral cancer. *Mol. Cancer Ther*. 11: 2401-2409; 2012.

Wang L., Zhang H., Sun M., Yin X., Qian J. High mobility group box 1 mediated autophagy promotes neuroblastoma cell chemoresistance. *Oncol. Rep*. 34: 2969-2976; 2015.

Wang T., Ning K., Lu T.X., et al. Increasing circulating exosomes-carrying TRPC5 predicts chemoresistance in metastatic breast cancer patients. *Cancer Sci.* 108: 448-454; 2017.

Wang X., Huang S., Chen J.L. Understanding of leukemic stem cells and their clinical implications. *Mol. Cancer.* 30; 16: 2; 2017.

Wang X.Y., Repasky E., Liu H.T. Antisense inhibition of protein kinase Calpha reverses the transformed phenotype in human lung carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 10; 250: 253-63; 1999.

Warburg O., Wind F., Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol* 8: 519-530; 1927.

Warner H.R. Superoxide Dismutase, Aging, and Degenerative Disease. *Free Radic. Biol. Med.* 17: 249-258; 1994.

Way K.J., Chou E., King G.L. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 181-7; 2000.

Ways D.K., Kukoly C.A., de Vente J., et al. MCF-7 breast cancer cells transfected with protein kinase C- α exhibit altered expression of other protein kinase C isoforms and display a more aggressive neoplastic phenotype. *J. Clin. Invest.* 95: 1906-1915; 1995.

Wei J.S., Greer B.T., Westermann F., et al. Prediction of clinical outcome using gene expression profiling and artificial neural networks for patients with neuroblastoma. *Cancer Res.* 64: 6883-91; 2004.

Wicha M.S., Liu S., Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 15; 66: 1883-90; 2006.

Wickström M., Dyberg C., Milosevic J., et al. Wnt/ β -catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance. *Nat. Commun.* 25; 6: 8904; 2015.

Williams D.A., Lemke T.L. Foye's principi di chimicafarmaceutica. 924-950; 2005.

Wilson T.R., Longley D.B., Johnston P.G. Chemoresistance in solid tumours. *Ann. Oncol.* 10: x315-24; 2006.

Witterland A.H.I., Koks C.H., Beijnen J.H. Etoposide phosphate, the water-soluble prodrug of etoposide. *Pharm. World Sci.* 18: 163-170; 1996.

Wu C.C., Li T.K., Farh L., et al. Structural basis of Type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science* 333: 459-462; 2011.

Xia T., Jiang H., Li C., Tian M., Zhang H. Molecular imaging in tracking tumor stem-like cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 420364; 2012.

Xu R., Liu S., Chen H., Lao L. MicroRNA-30a downregulation contributes to chemoresistance of osteosarcoma cells through activating Beclin-1-mediated autophagy. *Oncol. Rep.* 35: 1757-1763; 2016.

Yan Y., Zuo X., Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl. Med.* 4: 1033-1043; 2015.

Yao D., Dai C., Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol. Cancer Res.* 9: 1608-20; 2011.

Yao Z., Jones A.W., Fassone E., et al. PGC-1 β mediates adaptive chemoresistance associated with mitochondrial DNA mutations. *Oncogene.* 32: 2592-600; 2013.

Yeo L.P., Geerts D., Mocz G., Koster J., Bachmann A.S. Effect of sulfasalazine on human neuroblastoma: analysis of sepiapterin reductase (SPR) as a new therapeutic target. *BMC Cancer.* 15:477; 2015.

Ye X., Weinberg R.A. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell. Biol.* 25: 675-686; 2015.

Ye X.Q., Li Q., Wang G.H., et al. Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int. J. Canc.* 129: 820–831; 2011.

You M.L., Chen Y.J., Chong Q.Y., et al. Trefoil factor 3 mediation of oncogenicity and chemoresistance in hepatocellular carcinoma is AKT-BCL-2 dependent. *Oncotarget.* 13; 8: 39323-39344; 2017.

Yu F., Yao H., Zhu P., et al. Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell.* 14; 131: 1109-23; 2007.

Zeuner A., Francescangeli F., Contavalli P., et al. Elimination of quiescent/slow-proliferating cancer stem cells by Bcl-XL inhibition in non-small cell lung cancer. *Cell Death Differ.* 21: 1877-88; 2014.

Zhang H., Forman H.J. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23: 722-8; 2012.

Zhang H., Trachootham D., Lu W., et al. Effective killing of Gleevec-resistant CML cells with T315I mutation by a natural compound PEITC through redox-mediated mechanism. *Leukemia.* 22: 1191-9; 2008.

Zhang P., Zhang P., Shi B., et al. Galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis.* 9; 5: e991; 2014.

Zhang Y., Talalay P., Cho G.C., Posner G.H. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 6: 2399–2403; 1992.

Zhao J. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacol. Ther.* 160: 145-58; 2016.

Zhao L., Zhao Y., Schwarz B., et al. Verapamil inhibits tumor progression of chemotherapy-resistant pancreatic cancer side population cells. *Int. J. Oncol.* 49: 99-110; 2016.

Zhao Y., Butler E.B., Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis.* 7; 4: e532; 2013.

Zhao Y., Liu H., Liu Z., et al. Overcoming trastuzumab resistance in breast cancer by targeting dysregulated glucose metabolism. *Cancer Res.* 1; 71: 4585-97; 2011.

Zhou Y., Tozzi F., Chen J., et al. Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells. *Cancer Res.* 72: 304-314; 2012.

Zöller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer.* 11: 254-67; 2011.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Etoposide-resistance in a neuroblastoma model cell line is associated with 13q14.3 mono-allelic deletion and miRNA-15a/16-1 down-regulation

Received: 25 April 2018

Accepted: 17 July 2018

Published online: 13 September 2018

Barbara Marengo¹, Paola Monti², Mariangela Miele², Paola Menichini², Laura Ottaggio², Giorgia Foggetti^{2,3}, Alessandra Pulliero⁴, Alberto Izzotti^{2,4}, Andrea Speciale¹, Ombretta Garbarino¹, Nicola Traverso¹, Gilberto Fronza² & Cinzia Domenicotti¹

Drug resistance is the major obstacle in successfully treating high-risk neuroblastoma. The aim of this study was to investigate the basis of etoposide-resistance in neuroblastoma. To this end, a MYCN-amplified neuroblastoma cell line (HTLA-230) was treated with increasing etoposide concentrations and an etoposide-resistant cell line (HTLA-ER) was obtained. HTLA-ER cells, following etoposide exposure, evaded apoptosis by altering Bax/Bcl2 ratio. While both cell populations shared a homozygous *TP53* mutation encoding a partially-functioning protein, a mono-allelic deletion of 13q14.3 locus, where the *P53* inducible miRNAs 15a/16-1 are located, and the consequent miRNA down-regulation were detected only in HTLA-ER cells. This event correlated with BMI-1 oncoprotein up-regulation which caused a decrease in p16 tumor suppressor content and a metabolic adaptation of HTLA-ER cells. These results, taken collectively, highlight the role of miRNAs 15a/16-1 as markers of chemoresistance.

¹Department of Experimental Medicine, General Pathology Section, University of Genova, Genova, Italy. ²UOC Mutagenesis and Oncologic Prevention, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italy. ³Yale Cancer Center, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA. ⁴Department of Health Sciences, University of Genova, Genova, Italy. Barbara Marengo, Paola Monti, Gilberto Fronza and Cinzia Domenicotti contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.D. (email: Cinzia.Domenicotti@unige.it)

Research Paper

Glutathione-mediated antioxidant response and aerobic metabolism: two crucial factors involved in determining the multi-drug resistance of high-risk neuroblastoma

Renata Colla¹, Alberto Izzotti^{2,3}, Chiara De Ciucis¹, Daniela Fenoglio⁴, Silvia Ravera⁵, Andrea Speciale¹, Roberta Ricciarelli¹, Anna Lisa Furfaro⁶, Alessandra Pulliero², Mario Passalacqua¹, Nicola Traverso¹, Maria Adelaide Pronzato¹, Cinzia Domenicotti¹, Barbara Marengo¹

¹Department of Experimental Medicine, University of Genova, Genova, Italy

²Department of Health Sciences, University of Genova, Genova, Italy

³IRCCS AOU San Martino IST Genova, Genova, Italy

⁴Center of Excellence for Biomedical Research, Department of Internal Medicine, University of Genova, Genova, Italy

⁵Department of Pharmacy, University of Genova, Genova, Italy

⁶Giannina Gaslini Institute, Genova, Italy

Correspondence to: Barbara Marengo, email: Barbara.Marengo@unige.it

Keywords: neuroblastoma, multi-drug resistance, glutathione, antioxidants, aerobic metabolism

Received: March 18, 2016

Accepted: September 13, 2016

Published: September 23, 2016

ABSTRACT

Neuroblastoma, a paediatric malignant tumor, is initially sensitive to etoposide, a drug to which many patients develop chemoresistance. In order to investigate the molecular mechanisms responsible for etoposide chemoresistance, HTLA-230, a human MYCN-amplified neuroblastoma cell line, was chronically treated with etoposide at a concentration that *in vitro* mimics the clinically-used dose. The selected cells (HTLA-Chr) acquire multi-drug resistance (MDR), becoming less sensitive than parental cells to high doses of etoposide or doxorubicin. MDR is due to several mechanisms that together contribute to maintaining non-toxic levels of H₂O₂. In fact, HTLA-Chr cells, while having an efficient aerobic metabolism, are also characterized by an up-regulation of catalase activity and higher levels of reduced glutathione (GSH), a thiol antioxidant compound. The combination of such mechanisms contributes to prevent membrane lipoperoxidation and cell death. Treatment of HTLA-Chr cells with L-Buthionine-sulfoximine, an inhibitor of GSH biosynthesis, markedly reduces their tumorigenic potential that is instead enhanced by the exposure to N-Acetylcysteine, able to promote GSH synthesis.

Collectively, these results demonstrate that GSH and GSH-related responses play a crucial role in the acquisition of MDR and suggest that GSH level monitoring is an efficient strategy to early identify the onset of drug resistance and to control the patient's response to therapy.

Matrine in association with FD-2 stimulates F508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in the presence of corrector VX809

BARBARA MARENGO¹, ANDREA SPECIALE¹, LISA SENATORE¹, SILVANO GARIBALDI²,
FRANCESCA MUSUMECI³, ERIKA NIEDDU³, BENEDETTA POLLAROLO³, MARIA ADELAIDE PRONZATO¹,
SILVIA SCHENONE³, MAURO MAZZEI³ and CINZIA DOMENICOTTI¹

¹Department of Experimental Medicine; ²Division of Cardiology, IRCCS University Hospital San Martino, Research Centre of Cardiovascular Biology; ³Department of Pharmacy, University of Genoa, I-16132 Genoa, Italy

Received February 28, 2017; Accepted July 27, 2017

DOI: 10.3892/mmr.2017.7736

Abstract. Cystic fibrosis is caused by mutations of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, and the predominant mutation is termed Phe508del (F508del). Therapy for F508del-CFTR patients is based on the use of Orkambi®, a combination of VX809 and VX770. However, though Orkambi leads to an improvement in the lung function of patients, a progressive reduction in its efficacy has been observed. In order to overcome this effect, the aim of the present study was to investigate the role of matrine and the in-house compound FD-2 in increasing the action of VX809 and VX770. Fischer rat thyroid cells overexpressing F508del-CFTR were treated with matrine, VX809 (corrector) and/or with a number of potentiators (VX770, FD-1 and FD-2). The results demonstrated that matrine was able to stimulate CFTR activity and, in association with FD-2, increased the functionality of the channel in the presence of VX809. Based on these results, it may be hypothesized that FD-2 may be a novel and more effective potentiator compared with VX770.

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disorder caused by mutations of the gene that encodes the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein (1). This protein is a chloride (or bicarbonate)-conducting anion channel expressed on the membrane of epithelial cells of the

lung, intestines and pancreas, which modulates electrolytic exchange. Therefore, mutations in CFTR, leading to altered ion transport, induce a progressive deterioration of the target organs and, consequently, premature mortality of patients (2). CFTR mutations may induce alterations in maturation, subcellular localization (trafficking) and activity (gating) of the CFTR protein (3,4). The predominant CFTR mutation is termed Phe508del (F508del), and results in severely impaired protein maturation with a consequent alteration of CFTR membrane translocation (5,6). However, in the case that the F508del-CFTR is able to reach the plasma membrane, it exhibits reduced activity and stability in the membrane, in addition to a greater tendency towards degradation by the ubiquitin/proteasome system (7,8).

Research has primarily focused on the identification and development of modulators that are able to resolve gating and trafficking problems (9). The 'corrector' acts on trafficking and promotes CFTR membrane localization (10,11) while the 'potentiator' acts on gating and leads to an increase in CFTR activity (12). Therefore, any therapy should be designed by choosing the most appropriate modulator which is able to target the specific mutation. However, in patients with F508del-CFTR, it has been demonstrated that treatment with a potentiator is ineffective, since it is unable to induce CFTR maturation and membrane translocation. Therefore, in these patients, the co-administration of a corrector and a potentiator is necessary to allow for the almost complete repair of CFTR trafficking and gating (13).

At present, there are two molecules which are frequently used: The potentiator VX770 (ivacaftor) and the corrector VX809 (lumacaftor). Recently, the use of Orkambi®, which is a combination of VX770 and VX809, was approved (3). However, though an improvement in the quality of life of patients treated with the Orkambi was observed, the drug induced a modest improvement in lung function (14). This limited effect may be due to an inhibitory action exerted by VX770 on VX809 (15). In order to overcome this problem, research is focusing on the analysis of natural molecules that may resolve the problem at its origin; among them, matrine, an alkaloid extracted from roots of *Sophora flavescens*, appears to provide promising results. In

Correspondence to: Professor Cinzia Domenicotti, Department of Experimental Medicine, University of Genoa, 2L.B. Alberti Street, I-16132 Genoa, Italy
E-mail: cinzia.domenicotti@unige.it

Abbreviations: CF, cystic fibrosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; FRT, Fischer rat thyroid

Key words: CF, CFTR, matrine, VX809, VX770, FD-2, FRT cells