

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*XXV Ciclo***

Relazione 2° anno

**Isolamento e caratterizzazione genetica di linee cellulari
di Glioblastoma Multiforme.**

Candidata: Angela Piazzi

Tutor: Prof. Davide Schiffer
Prof.ssa Mara Giordano

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

Introduzione

In generale si ritiene che i tumori derivino da una singola cellula mutata da cui ha origine la trasformazione neoplastica. Due ipotetici modelli possono spiegare questo fenomeno: il modello stocastico e il modello gerarchico. Mentre il primo afferma che all'interno della massa tumorale tutte le cellule possiedono lo stesso potenziale tumorigenico, il secondo sostiene che solo una frazione di cellule possiede una significativa capacità neoplastica. Il modello gerarchico si sposa con la teoria delle cellule staminali tumorali (CSC), descritta nelle leucemie e poi estesa ad altri tumori solidi tra cui il GBM [1]. Le CSC sono caratterizzate da capacità proliferativa, auto-rinnovamento (*self-renewal*), capacità di differenziare nei tre differenti fenotipi neurali (astrocitario, oligodendrogiale e neuronale) e tumorigenicità [2]. Non è ancora stato stabilito se le CSC siano delle normali cellule staminali con danni alla propria funzione regolatoria o delle cellule *committed* diventate de-differenziate e con fenotipo simil-staminale.

Il Glioblastoma Multiforme è il più comune tumore primario del SNC negli adulti ed è classificato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) come astrocitoma di IV grado. Il GBM è costituito da una popolazione cellulare eterogenea, esprime *markers* tipici dei progenitori/staminali neurali, astrocitari e neuronali. Ad oggi non è ancora chiaro quali cellule, all'interno della massa tumorale, siano responsabili della formazione e del mantenimento del tumore [3]. È stato supposto che questo tumore possa originare dalla trasformazione maligna delle cellule staminali neurali multi potenti (NSC). Tali cellule, nell'adulto, sono localizzate nella zona subventricolare della corteccia cerebrale e nella zona subgranulare del giro dentato, dove migrano differenziandosi nei diversi *lineages* [4 - 6].

L'evidenza delle CSC nel GBM è dimostrata da studi *in vitro* su colture primarie. Cellule dissociate da prelievi tumorali sono in grado, in coltura con terreno addizionato di fattori di crescita (β FGF e EGF), di formare aggregati sferici fluttuanti, chiamati neurosfere (NS). In coltura, oltre alle NS, si possono ottenere anche cellule aderenti (AC), ossia cellule che crescono in monostrato con terreno addizionato di FBS (10%). Le AC risultano essere positive per i principali *markers* di differenziamento: GFAP (astrociti), Galattocerebroside (oligodendrociti) e β -III-tubulina (neuroni), e possiedono capacità tumorigenica ridotta o nulla [7 - 9].

Le cellule staminali tumorali rispondono quindi alla necessità di postulare nel tumore l'esistenza di una quota minoritaria di cellule responsabili della sua crescita, della recidiva e della resistenza alle terapie [10]. È stato infatti osservato che le CSC possiedono un'aumentata espressione di proteine anti-apoptotiche e molecole coinvolte nella resistenza alle chemioterapie nonché un'aumentata tolleranza ai danni indotti dalle radioterapie per eccesso dell'attività di riparo del DNA [11]. Per tale ragione, chemio e radioterapie falliscono nell'eradicazione completa della neoplasia; le cellule tumorali rimanenti, arricchite di CSC resistenti, possono essere causa di recidive [12].

Scopo del Lavoro

Il glioblastoma è una neoplasia caratterizzata da alta invasività; al momento della diagnosi, le cellule tumorali sono già migrate ad una grande distanza dal tumore primario. La resezione chirurgica, attuale terapia *standard*, e le radio-chemioterapie non sono in grado di rimuovere tutte le cellule tumorali, permettendo alla neoplasia di recidivare.

La caratterizzazione molecolare di linee cellulari di GBM può essere utile per l'identificazione delle CSC responsabili della radio- e chemio-resistenza e rappresenta quindi un'opportunità d'identificare *targets* e approcci terapeutici innovativi.

In questo studio, condotto su una serie di 21 GBM, si vuole verificare, dal punto di vista genetico, la relazione tra il tumore primitivo e le linee cellulari da esso derivate. La caratterizzazione molecolare ha compreso l'analisi delle seguenti alterazioni genetiche ed epigenetiche:

- Analisi della perdita di eterozigotà (LOH) per i cromosomi 1p, 10q, 17p e 19q;
- Analisi dello stato di amplificazione del gene *EGFR*;
- Analisi dello stato di metilazione del promotore del gene *MGMT*;
- Analisi mutazionale dei geni *TP53* (esoni 2-11), *PTEN* (esoni 1-9), *EGFR* (dominio TK, esoni 18-24), *IDH1* (esone 4) e *IDH2* (esone 4);
- Analisi delle delezioni a carico della regione cromosomica 9p e dello stato di metilazione dei promotori dei geni *CDKN2A* e *CDKN2B*.

Materiali e Metodi

CASISTICA

Lo studio è stato condotto su 21 casi di GBM emisferici primari parzialmente resecati operati presso il Dipartimento di Neuroscienze, Divisione di Neurochirurgia dell'Università di Torino, o pervenuti dalla Divisione di Anatomia Patologica dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara. La diagnosi istologica di GBM è stata effettuata secondo le linee guida WHO. L'età media dei pazienti, 13 maschi e 8 femmine, era di 65 anni (*range* 23 – 76 anni).

Il pezzo operatorio è stato diviso come segue: una parte è stata conservata a -80°C per le analisi di genetica molecolare, una è stata fissata in formalina tamponata e poi inclusa in paraffina, l'ultima è stata processata e dissociata enzimaticamente per l'allestimento di colture primarie.

Il DNA genomico (gDNA) tumorale è stato ottenuto dal prelievo operatorio destinato all'analisi genetica con la metodica di estrazione fenolo-cloroformio. È inoltre stato ottenuto per tutti i pazienti un prelievo di sangue venoso in anticoagulante EDTA conservato a -20°C e poi sottoposto ad estrazione mediante metodica *salting-out* al fine di ottenere il gDNA costitutivo.

COLTURE CELLULARI

Il prelievo tumorale è stato processato come descritto in letteratura [13]. Le condizioni di coltura, al 5% di O₂CO₂, sono state le seguenti:

- Neurosfere: DMEM/F12 addizionato di βFGF (10 ng/mL) e EGF (20 ng/mL);
- Aderenti: DMEM addizionato di FBS (10%).

Sono inoltre state impiegate, come linee cellulari di GBM di riferimento per la messa a punto, le linee U87-MG e 010627 (Galli R., DIBIT San Raffaele).

Tutte le linee cellulari sono state periodicamente controllate per la presenza di contaminazione da parte di *Mycoplasma* mediante l'e-Myco *Mycoplasma PCR Detection Kit* (iNtRON Biotechnology, Korea).

Il gDNA delle linee cellulari è stato estratto mediante il *QIAmp DNA Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hamburg, Germany).

ANALISI DELLA PERDITA DI ETEROZIGOSITA' (LOH) PER I CROMOSOMI 1p, 10q, 17p E 19q.

I microsatelliti utilizzati sono stati selezionati dalla letteratura e dalle principali banche dati disponibili in rete (<http://www.genome.ucsc.edu>, <http://www.cephb.fr/en/cephdb/browser.php>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/human>), tenendo conto della posizione del marcatore sul cromosoma e dell'informatività genetica (Tab. 1) [13 - 27].

	STR	LOCUS	ETEROZIGOSITA'	UNITA' RIPETUTA
1p	D1S508	1p36.23	0.812	(AC) _n
	D1S1612	1p36.23	0.929	(GGAA) _n
	D1S496	1p36.1-34.3	0.815	(AC) _n
	D1S2724	1p33	0.821	(AC) _n
	D1S457	1p13.3	0.742	(AC) _n
	D1S2696	1p11.1	0.889	(AC) _n
10q	D10S212	10q26.3	0.740	(AC) _n
	D10S190	10q26.11	0.863	(AC) _n
	D10S562	10q25.3	0.715	(AC) _n
17p	TP53 Alu	17p13.1	0.594	(AAAAT) _n
	D17S520	17p13	0.854	(AC) _n
19q	D19S908	19q13.3	0.714	(AC) _n
	D19S219	19q13.32	0.770	(AC) _n
	D19S412	19q13.33	0.812	(AC) _n
	D19S902	19q13.34	0.893	(AC) _n

Tabella 1 Elenco dei marcatori utilizzati per l'analisi dell'LOH. STR: *Short Tandem Repeat*.

I microsatelliti sono stati amplificati mediante reazioni di PCR *multiplex* con *primers* fluorescenti. Gli ampliconi sono stati successivamente separati per elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). I dati sono stati analizzati mediante l'impiego del software *GeneMapper v.4.0* (Applied Biosystems). Il calcolo della perdita di eterozigosi è stato eseguito misurando, per ogni marcatore, la differenza del rapporto allelico tra il campione di DNA costitutivo e il DNA tumorale. Valori <0.5 e >1.5 sono stati considerati indice di LOH.

STATO DI AMPLIFICAZIONE DEL GENE *EGFR*

Lo stato di amplificazione del gene *EGFR* è stato valutato mediante analisi di frammenti ed elettroforesi capillare. Il gene *INF-γ* è stato impiegato come gene *housekeeping* di riferimento. L'amplificazione è stata determinata misurando il rapporto tra le altezze dei picchi corrispondenti a *EGFR* e *INF-γ*. Un rapporto superiore a 2.09 è considerato evidenza della presenza di più di due copie del gene *EGFR* [28].

METILAZIONE DEL PROMOTORE DEL GENE *MGMT*

Per l'analisi dello stato di metilazione del gene *MGMT*, un microgrammo di gDNA è stato modificato con con bisolfito di sodio (*MethylEasy DNA Bisulphite Modification Kit* - Human Genetic Signatures Pty Ltd,

Macquarie Park, Sydney, Australia) e successivamente è stato sottoposto a PCR metilazione-specifica (MS-PCR) ed elettroforesi capillare [29 - 31].

Come controlli di reazione sono stati impiegati il *CpGenome Universal Methylated DNA* (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) e DNA linfocitario normale rispettivamente come campione metilato e non-metilato.

Per la valutazione dello stato di metilazione, è stato misurato il rapporto tra le altezze dei picchi corrispondenti all'amplicone metilato e a quello non metilato. Valori superiori a 0.1 sono stati considerati evidenza dello stato di metilazione del promotore del gene *MGMT*.

ANALISI MUTAZIONALE DEI GENI *TP53*, *PTEN*, *EGFR*, *IDH1* E *IDH2*

L'analisi mutazionale è stata condotta mediante sequenziamento diretto bidirezionale sui seguenti geni:

- *TP53*: esoni 2 – 11;
- *PTEN*: esoni 1 -9 ;
- *EGFR*: esoni 18 – 24 (dominio tirosin-chinasico);
- *IDH1*: esone 4 (codone Arg132);
- *IDH2*: esone 4 (codone Arg 172).

ANALISI DELLE DELEZIONI A CARICO DEL CROMOSOMA 9p E DELLO STATO DI METILAZIONE DEI GENI *CDKN2A* E *CDKN2B* MEDIANTE MS-MLPA

La *Methylation Specific MLPA* (MS-MLPA) è una metodica che permette l'analisi contemporanea dello stato di metilazione e della variazione del numero di copie. Come in una normale reazione di MLPA, il gDNA viene dapprima denaturato e successivamente fatto ibridare con sonde specifiche per le regioni d'interesse. I complessi DNA/sonda vengono poi simultaneamente legati, attraverso una reazione ligasica, e digeriti da un enzima metilazione-specifico (Hha I, Promega, Madison, WI, USA). Se i siti CpG risultano metilati verrà generato un normale prodotto di MLPA. Se il sito CpG non risulta metilato, il complesso DNA/sonda verrà digerito dall'enzima di restrizione e non si formerà alcun prodotto di amplificazione [32].

Il locus *CDKN2B* codifica per la proteina p15 mentre il locus *CDKN2A* codifica per p16 e p14. Tali proteine differiscono per il primo esone, rispettivamente 1 α e 1 β , dando luogo ad una cornice di lettura alternativa senza omologia a livello proteico (Fig. 1).

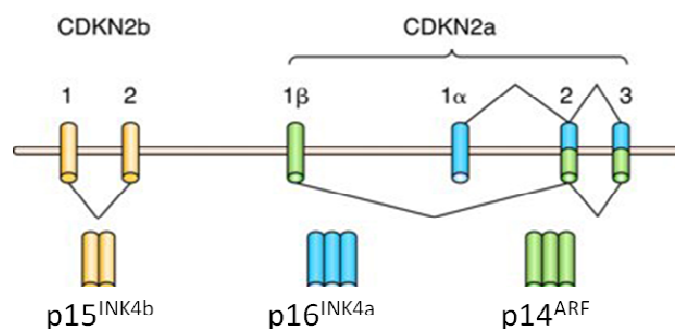


Figura 1 Rappresentazione grafica dei loci *CDKN2A* e *CDKN2B* sul cromosoma 9p.

L'analisi è stata condotta mediante il *SALSA MLPA ME024-A1 9p21 CDKN2A/CDKN2B Region Probemix* (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) secondo il protocollo fornito dal kit. Le sonde impiegate per la caratterizzazione delle delezioni a carico della regione 9p comprendono:

- 10 Sonde per il *loci* 9p24.3 – 9p22
- 13 Sonde per il *locus* *CDKN2A* (9p21.3);
- 7 Sonde per il *locus* *CDKN2B* (9p21.3);

Le sonde impiegate per l'analisi dello stato di metilazione comprendono:

- 2 Sonde per il promotore di p16;
- 3 Sonde per il promotore di p14;
- 4 Sonde per il promotore di p15.

Successivamente i prodotti della reazione di MLPA sono stati analizzati per elettroforesi capillare. La normalizzazione dei dati ottenuti mediante MS-MLPA è stata effettuata con l'ausilio del *software* *MRC-Coffalyser* v.9.4 (<http://old.mlpa.com/coffalyser>). L'interpretazione dei valori normalizzati è invece stata effettuata secondo il seguente schema (Tab. 2):

VALORI	SIGNIFICATO
< 0.2	Delezione in Omozigosi
0.2 < X > 0.7	Delezione in Eterozigosi
0.7 < X > 1.4	Normalità
> 1.4	Guadagno

Tabella 2 Corrispondenza tra i valori delle sonde e significato associato.

È stata considerata evidenza di metilazione la presenza di almeno due sonde, contenenti il sito per Hhal, con percentuale di metilazione maggiore di 10% [32].

Risultati

COLTURE IN VITRO

Dei 21 campioni operatori di GBM sono state ottenute (Tab. 3):

LINEA CELLULARE	N° CASI
NS	10
AC	12
NESSUNA	4

Tabella 3 Linee cellulari generate dai 21 GBM messi in coltura.

In particolare, solo 4 casi su 21 hanno generato in coltura sia NS che AC. Di ogni linea è stata valutata la capacità proliferativa e per le NS sono state anche dimostrate le altre tre caratteristiche tipiche delle CSC: differenziamento con DMEM addizionato di FBS, clonigenicità e tumorigenicità *in vivo*.

ANALISI DELLA LOH PER I CROMOSOMI 1p, 10q, 17p E 19q.

La genotipizzazione dei 15 microsatelliti utilizzati per l'analisi della LOH ha permesso di confermare la derivazione di ogni linea cellulare dal corrispondente tumore primario di origine.

Le frequenze delle delezioni riscontrate per i cromosomi 1p, 10q, 17p e 19q sono riportate nelle tabelle 4 (a-d).

		Frequenza di Delezione	N° casi non informativi	Concordanza Linea/Tumore
1p (a)	T	6/21 (28.6%)	0	
	NS	2/10 (20%)	0	2/2 (100%)
	AC	1/12 (8.3%)	0	1/12 (8.3%)

		Frequenza di Delezione	N° casi non informativi	Concordanza Linea/Tumore
10q (b)	T	19/19 (100%)	2	
	NS	8/8 (100%)	2	8/8 (100%)
	AC	1/11 (9.1%)	1	1/11 (9.1%)

		Frequenza di Delezione	N° casi non informativi	Concordanza Linea/Tumore
17p (c)	T	26.3 % (5/19)	4	
	NS	66.7 % (4/6)	4	100 % (6/6)
	AC	0 % (0/10)	2	0

		Frequenza di Delezione	N° casi non informativi	Concordanza Linea/Tumore
19q (d)	T	7/21 (33.3%)	0	
	NS	5/6 (83.3%)	0	4/5 (80%)
	AC	0/10 (0%)	0	0

Tabella 4 Frequenza di delezione riscontrata per numero di casi informativi per le regioni cromosomiche 1p (a), 10q (b), 17p (c) e 19q (d) e relative concordanze.

AMPLIFICAZIONE DEL GENE *EGFR*

Il gene *EGFR* è risultato amplificato nei seguenti casi (Tab. 5):

		Frequenza di Amplificazione	Concordanza Linea/Tumore
EGFR	T	10/21 (47.6%)	
	NS	4/10 (40%)	2/4 (50%)
	AC	0/12 (0%)	0

Tabella 5 Frequenza dell'amplificazione genica di *EGFR* e relativa concordanza.

ANALISI MUTAZIONALE

Il profilo mutazionale dei 21 GBM analizzati e delle rispettive linee cellulari è mostrato in Tab. 6:

		TP53		PTEN		EGFR TK	
		CDS VARIATION	AA VARIATION	CDS VARIATION	AA VARIATION	CDS VARIATION	AA VARIATION
CV1	T	Wt	-	Wt		Wt	-
	NS	Wt	-	c.538T>C° c.541delC°	p.H180Y° p.L181fs*1°	Wt	-
	AC	Wt	-	c.538T>C° c.541delC° IVS5-87C>T	p.H180Y° p.L181fs*1° ?	Wt	-
CV2	T	Wt	-	c.1061C>T°	p.P354L*°	Wt	-
	AC	Wt	-	c.1061C>T	p.P354L	Wt	-
CV3	T	IVS7-35A>G	?	Wt	-	Wt	-
	AC	Wt	-	Wt	-	Wt	-
CV4	T	Wt	-	c.170_171insT	p.L57fs*6	Wt	-
	AC	Wt	-	Wt	-	Wt	-
CV5	T	c.713G>A	p.C238Y	Wt	-	Wt	-
CV6	T	Wt	-	Wt	-	c.2904C>T°	p.F968F°
	AC	Wt	-	Wt	-	Wt	-
CV7	T	c.527G>A	p.C176Y	c.395G>A°	p.G132D°	Wt	-
	NS	c.527G>A°	p.C176Y°	c.395G>A°	p.G132D°	Wt	-
CV8	T	Wt	-	IVS3+1G>T	?	Wt	-
	AC	Wt	-	Wt	-	Wt	-
CV9	T	Wt	-	c.388C>T	p.R130*	Wt	-
	AC	Wt	-	Wt	-	Wt	-
CV10	T	Wt	-	c.954_957delTACT	p.L318fs*2	Wt	-
	NS	Wt	-	c.954_957delTACT°	p.L318fs*2°	Wt	-
CV11	T	Wt	-	c.371G>A	p.C124Y	Wt	-
CV13	T	Wt	-	Wt	-	Wt	-
	NS	Wt	-	IVS6+2T>G°	?	Wt	-
CV15	T	c.210_372del	p.A70_T123del	Wt	-	Wt	-
CV16	T	Wt	-	c.754G>A	p.D252N	Wt	-
CV17	T	IVS4+5G>C	?	c.238C>T	p.Q110*	Wt	-
	NS	IVS4+5G>C°	?	c.238C>T°	p.Q110*°	Wt	-
	AC	Wt	-	Wt	-	Wt	-
	MS	IVS4+5G>C°	?	c.238C>T°	p.Q110*°	Wt	-
CV20	T	c.473G>T c.817C>T	p.R158L p.R273C	Wt	-	Wt	-
	NS	c.473G>T c.817C>T	p.R158L p.R273C	Wt	-	Wt	-
CV21	T	Wt	-	Wt	-	Wt	-
	NS	Wt	-	Wt	-	Wt	-
	AC	Wt	-	Wt	-	Wt	-
NO2	T	Wt	-	c.954_957delTACT°	p.L318fs*2°	Wt	-
	AC	Wt	-	Wt	-	Wt	-
NO3	T	Wt	-	c.331T>C	p.W111R	Wt	-
	NS	Wt	-	c.331T>C°	p.W111R°	Wt	-
	AC	Wt	-	c.331T>C°	p.W111R°	Wt	-
NO4	T	c.535C>T	p.H179Y	Wt	-	Wt	-
	NS	c.535C>T°	p.H179Y°	Wt	-	Wt	-
	AC	Wt	-	Wt	-	Wt	-
NO6	T	Wt	-	Wt	-	Wt	-
	AC	Wt	-	Wt	-	Wt	-

Tabella 6

Profilo mutazionale dei casi analizzati per i geni *TP53*, *PTEN* e *EGFR*. Il numero delle variazioni introniche è relativo al primo (+1) o all'ultimo (-1) nucleotide del corrispondente introne.

Wt: *wild type*.

° Mutazioni osservate in sequenza in omozigosi. In realtà vi è la delezione di un allele per LOH.

Il gene più frequentemente mutato è risultato essere *PTEN* con 13/18 tumori primitivi (72.2%) seguito da *TP53* con 7/18 casi (38.9%) e *EGFR* con un solo tumore mutato (5.6%). Relativamente ai geni *IDH1* e *IDH2*, tutti i tumori primitivi e le corrispondenti linee cellulari sono risultati non mutati.

Tutte le mutazioni identificate nei tumori primitivi sono risultate di origine somatica. Le stesse mutazioni sono state osservate anche nelle NS deriva tema non nelle AC.

ANALISI DELLO STATO DI METILAZIONE DEL GENE *MGMT*

Il promotore del gene *MGMT* è risultato metilato con le seguenti frequenze:

		Metilazione	Concordanza Linea/Tumore
MGMT	T	10/21 (47.6%)	
	NS	6/10 (60%)	4/6 (66.7%)
	AC	0/12 (0%)	0

Tabella 6 Frequenze d'ipermetilazione del promotore del gene *MGMT* e relativa concordanza.

La concordanza tra il dato dei tumori primari e delle relative NS è stata del 66.7% (4/6) mentre per le AC non è stata rilevata metilazione di *MGMT*.

ANALISI DELLA REGIONE 9p MEDIANTE MS-MLPA

La casistica caratterizzata ha invece mostrato la seguente distribuzione (Tab. 8):

		Delezione p15	Delezione p14	Delezione p16	Concordanza Linea/Tumore
<i>CDKN2A</i> <i>CDKN2B</i>	T	13/21 (61.9%)	61.9 % (13/21)	61.9 % (13/21)	
	NS	6/10 (60%)	6/10 (60%)	6/10 (60%)	6/6 (100%)
	AC	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0

Tabella 7 Frequenze di delezione per i geni codificanti p15, p14 e p16 e relativa concordanza.

Nei tumori la delezione dei suddetti geni è stata identificata in eterozigosi a causa della contaminazione di cellule normali non tumorali. Nelle NS derivate, al contrario, le stesse delezioni sono state identificate in omozigosi.

Per quanto riguarda lo stato di metilazione dei geni *CDKN2A* e *CDKN2B*, è stata riscontrata metilazione, di tutti e tre i promotori, solo in 4 NS su 10 (40%) ma non nei corrispondenti tumori primitivi. In 3 tumori primitivi su 21 (CV4, CV7 e CV20) è stata rilevata la metilazione del promotore del gene codificante per p16 ma non per p14 e p15. Non sono invece state identificate metilazioni a carico di questi *loci* in nessuna linea di AC.

Discussione

Le CSC possiedono delle potenziali e profonde implicazioni sia per il loro interesse negli studi di biologia di base sia per lo sviluppo di nuovi *targets* terapeutici. Fondamentale è l'osservazione che la metodologia di coltura impiegata influenza il tipo cellulare che ne deriva, questo comporta interpretazioni differenti nell'identificazione delle CSC [33]. Una lunga diatriba è in corso sulle modalità di coltura [34 - 35].

In questo studio, ci siamo attenuti ai paradigmi usati da Galli *et al.* 2004 [13] e da altri con la distinzione tra NS e AC [36 - 37]. Queste ultime rappresentano lo stadio differenziato delle cellule. Nella

nostra esperienza la differenziazione segue le tappe della normale citogenesi neurale consentendo di stabilire un *cut-off* oltre il quale non sussiste più staminalità [38]. Il potere tumorigenico delle cellule è pertanto adeguato al loro grado di staminalità.

In questo studio sono stati analizzati 21 casi di GBM emisferici primari (cioè sorti come tali e non secondari alla trasformazione di un astrocitoma di grado inferiore) parzialmente resecati; dai campioni tumorali messi in coltura si sono ottenute NS in 10 casi e AC in 12 casi. Solo 4 casi hanno dato origine sia a NS che ad AC mentre altri 4 casi non hanno originato linee cellulari.

La frequenza delle alterazioni genetiche ed epigenetiche analizzate è concordante con la natura primaria dei 21 GBM [39]. Del resto, secondo molte concezioni, è difficile ottenere NS da GBM secondari che addirittura potrebbero originare non da cellule staminali, ma da progenitori non situati negli strati sub-ventricolari, come gli oligodendroglioni [40].

La perdita di eterozigotità a carico dei *loci* 1p, 10q, 17p e 19q, lo stato di amplificazione di *EGFR*, l'ipermetilazione del promotore di *MGMT* e le mutazioni a carico di *PTEN* e *TP53* sono state identificate con frequenza simile nei tumori primitivi e nelle NS derivate ma non nelle AC. La concordanza tra tumore primitivo e NS risulta particolarmente evidente per quanto riguarda i profili di LOH, che non sono stati osservati nelle AC. Lo sbilanciamento allelico è risultato parziale nei tumori primitivi, a causa della contaminazione di cellule normali nel prelievo operatorio, e completo nelle relative NS. Nelle cellule AC non sono state rilevate alterazioni genetiche ed epigenetiche comuni ai rispettivi tumori ad esclusione di alcune mutazioni del gene *PTEN*.

Da rilevare è che la formazione di NS è strettamente legata all'esistenza, nel prelievo di partenza, del fenotipo GBM più maligno (cellule addensate proliferanti, addensamento dei vasi, alto numero di mitosi o di nuclei positivi ai *markers* di proliferazione). Ciò significa che le CSC sono contenute in quel fenotipo. Questo però può anche significare, contro l'ipotesi delle CSC come "*tumor initiating cells*", che la staminalità nel tumore non sia altro che uno "stato" che può essere raggiunto per regressione embrionale delle cellule tumorali. Questo processo di de-differenziazione è conseguenza dell'accumulo delle mutazioni che si realizza nella trasformazione. Questa è l'ipotesi funzionale delle CSC (Fig. 2) [41]. Succede esattamente l'opposto di quello che si realizza invece nell'evolversi della citogenesi normale e questo spiegherebbe il rapporto che si rileva tra NS e AC. Nella de-differenziazione, per effetto dell'accumulo di mutazioni e di alterazioni epigenetiche, nascerebbero nuovi cloni più maligni che sostituirebbero i predecessori attraverso una sorta di "competizione selettiva".

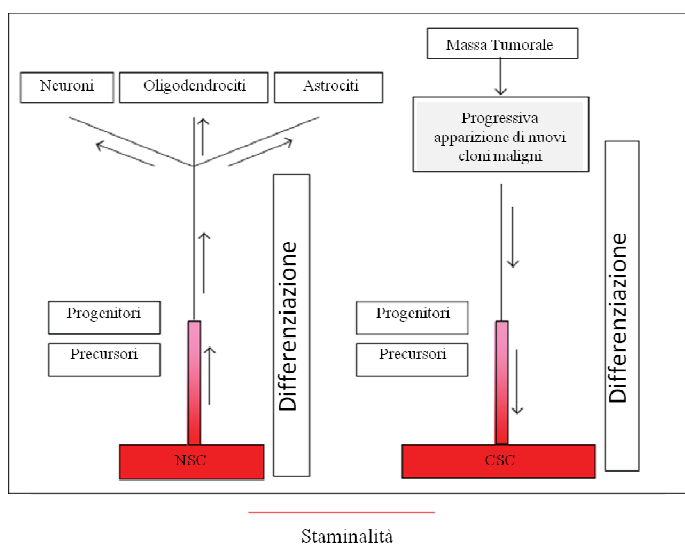


Figura 2

Schema di un'ipotetica distribuzione di staminalità durante la differenziazione e la de-differenziazione. La staminalità decresce dallo stadio di NSC attraverso i progenitori e le cellule mature. Al contrario, nel tumore aumenta fino allo stadio massimo di CSC [38].

NSC: Neural Stem Cell

CSC: Cancer Stem Cell

Le CSC rappresentano una quota minore di cellule all'interno della neoplasia e il fenotipo da cui derivano non è sempre presente nel campione utilizzato per la coltura. Questo è in accordo con quanto sopra detto sulla frequenza delle NS nei GBM.

L'esistenza di CSC nei tumori può per tanto essere stabilita solo in base alla risposta positiva della coltura successiva all'intervento chirurgico. Ai fini terapeutici sarebbe molto utile disporre di un *marker in vivo* specifico per le CSC o di staminalità. Questo sarebbe molto importante perché la staminalità si associa alla resistenza alla radio- e chemioterapia, come documenta una ricca letteratura [42].

Il problema fondamentale tuttavia non è tanto quello di stabilire se un glioblastoma è resistente o no *in vivo*, onde poter stabilire la strategia terapeutica prima dell'intervento, quanto di rilevare "dove" siano localizzate le CSC nel tumore alla Risonanza Magnetica a diffusione, per poterle aggredire con i mezzi terapeutici di cui si dispone.

Bibliografia

1. Piccirillo SGM, Watts C, (2011), *Neuro Oncol*, **6(11)**: 10-12;
2. Gürsel DB, Shin BJ, Burkhardt J-K, Kesavabhotla K, Schlaff CD, Boockvar JA, (2001), *Cancers*, **3**: 2655-2666;
3. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS, (2004), *Oncogene*, **23**: 9392-9400;
4. Louis DN, (2006), *Annu Rev Pathol Mech Dis* **1**: 97-117;
5. Facchino S, Abdouh M, Bernier G, (2011), *Cancers*, **3**: 1777-1797;
6. Lim SK, Llaguno SRA, McKay RM, Parada LF, (2011), *BMB reports*, **44(3)**: 158-164;
7. Reynolds BA, Weiss S, (1992), *Science*, **255(5052)**: 1707-1710;
8. Laks DR, Visnyei K, Kornblum HI, (2010), *Yonsei Med J*, **51(5)**: 633-640;
9. Dimov I, Tasić-Dimov D, Conić I, Stefanovic V, (2011), *TheScientificWorldJOURNAL*, **11**: 930-958;
10. Filed M, Alvarez A, Bushnev S, Sugaya K, (2010), *Clin Neurosurg*, **57**: 151-159;
11. Bagley RG, B.A.T., "Cancer drug discovery and development: stem cells and cancer", 2009, *Humana Press*.
12. Rodrigues Alves T, Souza Lima FR, Assad Kahn S, Lobo D, Feijó Dubois LG, Soletti R, Borges H, Moura Neto V, (2011), *Life Sci*, doi:10.1016/j.lfs.2011.04.022;
13. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A, (2004), *Cancer Res*, **64**: 7011-7021;
14. Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M, (2005), *Clin Cancer Res*, **11(3)**: 1119-1128;
15. Gil-Salù JL, Nieto A, Rodríguez-Guetiérrez JF, Almarcha J, (2007), *Neurocirugía (Astur)*, **18(4)**, 285-293;
16. Hashimoto N, Murakami M, Takahashi Y, Fujimoto M, Inazawa J, Mineura K, (2003), *Cancer*, **97(9)**: 2254-2261;
17. Gresner SM, Rieske P, Wozniak K, Piaskowski S, Jaskolski DJ, Skowronski W, Sikorska B, Papierz W, Liberski PP, (2007), *Acta Eurobiol Exp*, **67**: 103-112;
18. Dong Z, Pong JCS, Ng MH, Poon WS, Zhan WS, Ng HW, (2004), *Br J Cancer*, **91**: 1105-1111;
19. Kelly JJP, Blough MD, Stechinshin ODM, Chan JAW, Beauchamp D, Perizzolo M, Demetrick DJ, Steele L, Auer RN, Hader WJ, Westgate M, Parney IF, Jenkins R, Cairncross JG, Weiss S, (2010), *Neuro Oncol*, **12(7)**: 745-755;
20. Boulay JL, Miserez AR, Zwifel C, Wasner M, Van Meir E, Tolnay M, Reifenberger G, Merlo A, (2007), *PLoS One*, **6(e576)**: 1-9;

21. Eoli M, Bissola L, Bruzzone MG, Pollo B, Maccagno C, De Simone T, Valletta L, Silvani A, Bianchessi D, Broggi G, Boiardi A, Finocchiaro G, (2006), *Int J Cancer*, **119**, 84-90;
22. Ishii D, Natsume A, Wakabayashi T, Hatano H, Asano Y, Takeuchi H, Shimato S, Ito M, Fujii M, Yoshida J, (2007), *Neurol Med Chir*, **47**, 341-350;
23. Fathi AR, Vassella E, Arnold M, Curschmann J, Reinert M, Vajatai I, Weis J, Deiana G, Mariani L, (2007), *Strahlenther Onkol*, **183(9)**, 517-522;
24. Ramirez C, Bowman C, Maurage CA, Dubois F, Blond S, Porchet N, Escande F, (2010), *Neuro Oncol*, **12(5)**: 490-499;
25. Wooten EC, Fults D, Duggirala R, Williams K, Kyritsis AP, Bondy ML, Levin VA, O'Connell P, (1999), *Neuro Oncol*, **1(3)**: 169-176;
26. Azofeifa J, Hahn M, Ruiz M, Hummerich L, Morales AI, Jimenez G, Barrantes R, (2004), *Rev Biol Trop*, **52(3)**: 645-657;
27. Lin M, Cai D, Luo M (2003), *Chin Med J*, **116(8)**: 1156-1160;
28. Waha A, Rollbrocker B, Wiestler OD, Von Deimling A, (1992), *Diagn Mol Pat*, 1996, **5(2)**: 147-150;
29. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC et al, (1999), *Cancer Res*, **59(4)**: 793-797;
30. Mellai M, Caldera V, Annovazzi L, Chiò A, Lanotte M, Cassoni P, Finocchiaro G, Schiffer D, (2009), *Cancer genomics and proteomics*, **6(4)**: 842-845;
31. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB, (1996), *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 9821-9826;
32. Nygren AOH, Ameziane N, Duarte HMB, Vijzelaar RNCP, Waisfisz, Hess CJ, Schouten JP, Errami A, (2005), *Nucleic Acids Res*, **33(14)**: e128;
33. Natsume N, Kinjo S, Yuki K, Kato T, Ohno M, Motomura K, Iwami K, Wakabayashi T, (2011), *Brain Tumor Pathol*, **28**: 1-12;
34. Reynolds BA, Vescovi AL, (2009), *Cell Stem Cell*, **5**: 466-467;
35. Pollard SM, Yashikawa K, Clarke ID, DAnovi D, Stricker S, Russel R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M, Squire JA, Smith A, Dirks P, (2009), *Cell Stem Cell*, **4**: 568-580;
36. Günther HS, Schmidt NO, Phililips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszuz K, (2008), *Oncogene*, **27**: 2897-2909;
37. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donon NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA, (2006), *Cancer Cell*, **9**: 391-403;
38. Caldera V, Mellai M, Annovazzi L, Piazzzi A, Lanotte M, Cassoni P, Schiffer D, (2011), *J Oncol*, **2011**: 314962, Epub 2011 Aug 18;
39. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, (2007), *"WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System"*, 4th Ed., Lyon, IARC;

40. Weiss WA, Byrns MJ, Hackett C, Aldape K, Hill JR, Kuriyama H, Kuriyama N, Milshteyn N, Roberts T, Wendland MF, DePinho R, Israel MA, (2003), *Cancer Res*, **63(7)**: 1589-1595;
41. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA, (2006), *Nat Rev Cancer*, **6**: 425-436;
42. Schiffer D, Annovazzi L, Caldera V, Mellai M, (2010), *Anticancer Res*, **30**: 1977-1998;

SEZIONE 2

Seminari

2° ANNO:

15 Ottobre 2010: "Epidemiologia dell'infezione tubercolare latente tra gli immigrati a Torino" S. Mercadante, I. Baussano, M. Bugiani

11 Novembre 2010: "Biom mineralization and preparation of biomimetic nanoapatites", Dott. Jaime Gómez Morales

11 Novembre 2010: "Characterization of biomimetic nanopartites" Dott. Jose Mauel Delgado López

2 Marzo 2011: "Linfomi cutanei primitivi" Prof. Emilio Berti

25 Marzo 2011: "Amylotrophic lateral sclerosis" Dott.ssa Lucia Corrado

1 Aprile 2011: "Parkinson and Alzheimer Diseases" Prof. Cristoforo Comi

12 Aprile 2011: "Ferritins: ancient proteins with novel unexpected features" Dr.ssa Sonia Levi

13 Aprile 2011: "Metabolic syndrome: the gastroenterologist point of view" Dr.ssa Elisabetta Bugianesi

29 Aprile 2011: "Liver fibrosis in children affected by NASH: how to investigate that" Dr. Valerio Nobili

03 Maggio 2011: "Reverse vaccination in autoimmune diseases?" Prof. Gilberto Filaci

09 Maggio 2011: "Innate immunity and the pathogenicity of inhaled microbial particles" Prof. Henrik Wolff

13 Maggio 2011: "Farmacologia dell'aterosclerosi" Prof. Alberto Corsini

19 Maggio 2011: "Mechanisms and models of TDP-43 proteinopathies" Prof. Leonardo Petrucelli

17 Giugno 2011: "Molecular pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease" Prof. Mauro Fasano

1 Luglio 2011: "Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis" Prof. Maurizio Parola

1° ANNO

17 Novembre 2009: "ALK e tumorigenesi", Prof. Roberto Chiarle;

30 Novembre 2009: "Use of MAR epigenetic regulators for therapeutic expression", Prof. Nicolas Mermond;

14 Dicembre 2009: "Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare", Prof. Fabio Grassi;

14 Gennaio 2010: "Clinical significance of antinuclear antibodies in autoimmune liver disease", Prof. Pietro Invernizzi;

20 Gennaio 2010: "LSD1, Lysine Specific Demethylase 1, insight into a new epigenetic regulator involved in neuronal gene regulation", Dott.ssa Elena Battaglioli;

28 Gennaio 2010: "Dal difetto genetico all'inflammation", Prof. Luigi Maiuri;

9 Febbraio 2010: "R&D of magnetic-nanoparticles and carriers for drug", Dott. Giovanni Baldi;

10 Febbraio 2010: "Anticorpi nel Laboratorio Analisi, luci e colori al servizio del paziente", Dott. Matteo Vidali;

3 Marzo 2010: "Basi genetiche del diabete di tipo 1 e della sclerosi multipla: l'esempio della popolazione sarda", Prof. Francesco Cucca;

5 Marzo 2010: "The wonders of yeast: yeast as a model organism", Prof. Steve Ellis;

8 Marzo 2010: "Chromosome 5q deletions in MDS: genotype/phenotype relationships", Prof. Steve Ellis;

9 Marzo 2010: "Desatinib: transforming an adverse event into a new therapeutic target"; Prof. Steve Ellis

12 Marzo 2010: "Marcatori biologici per la diagnosi precoce della malattie neurodegenerative", Prof. Elio Scarpini;

14 Giugno 2010: "Fenotipo e cellule staminali tumorali nei gliomi maligni", Prof. Davide Schiffer, Dott.ssa Marta Mellai, Dott.ssa Valentina Caldera;

15 Giugno 2010: "Nuove strategie anticancro: i microRNA come agenti differenziativi per i tumori solidi", Prof.ssa Carola Ponzetto;

5 Luglio 2010: "Role of membrane lipids in neuronal synapses", Dott.ssa Paola Camoletto;

6 Settembre 2010: "Ruolo delle microvescicole nella comunicazione tra cellule", Prof. Giovanni Camussi;

17 Settembre 2010: "Prevention and cure of autochthonous mammary carcinomas in her2 transgenic mice?", Prof. Federica Cavallo

22 Settembre 2010: "Le cellule staminali tumorali: dalla biologia alla clinica", Prof. Ruggero De Maria;

23 Settembre 2010: “Preventing Persisters: Targeting epigenetic changes in cancer chemotherapy”, Prof. Steve Ellis

Corsi Frequentati

2° ANNO

Lezioni Prof. Albano “Introduction to systemic degenerative diseases” 4-11-18 marzo 2011;

Corso “Biotecnologie e Medicina”, Università del Piemonte orientale “A. Avogadro” – Facoltà di Medicina e Chirurgia, 10 Novembre 2010;

Corso Nazionale AIOM e SIAPEC-IAP “Determinazione delle mutazioni di *EGFR* nel NSCLC” e “Determinazione delle mutazioni di *KRAS* nel carcinoma del colon-retto”, Istituto Europeo di Oncologia, Milano 14 Aprile 2011;

Corso di Genetica Medica, Angelicum – Pontificia Università S.Tommaso D’Aquino, Ospedale Bambino Gesù, Roma 23-24 Giugno 2011.

Corso di Aggiornamento “L’avvento della Citogenetica Molecolare: una rivoluzione nella diagnosi delle malattie genetiche”, Ospedale Infantile Regina Margherita – Dipartimento di Scienze Pediatriche, Torino 30 Giugno 2011;

1° ANNO

Lezioni Oncologia Prof. Albano: 21 Maggio, 31 Maggio e 18 Giugno 2010.

Congressi

47° Congresso Nazionale dell’Associazione Italiana di Neuropatologia – 37° Congresso Annuale dell’Associazione Italiana per la Ricerca sull’Invecchiamento Cerebrale, Genova 19-21 Maggio 2011;

Convegno “Obesità e Tiroide: opinioni a confronto. Nuove visioni di una vecchia questione”, Istituto Auxologico Italiano, Verbania – Villa Caramora, 18 Giugno 2011;

Comunicazioni a Congressi

2° ANNO

XV Congresso Nazionale AINO, Fuggi (FR) 3-6 Ottobre 2010, “Le mutazioni dei geni *IDH1* e *IDH2* nei tumori neuro-epiteliali e le loro correlazioni molecolari”, M. Mellai, **A. Piazzi**, O. Monzeglio, G. Valente, D. Schiffer.

XIII Congresso Nazionale SIGU, Firenze 14-17 Ottobre 2010, “Le mutazioni dei geni *IDH1* e *IDH2* nei gliomi e le loro correlazioni molecolari”, M. Mellai, **A. Piazzi**, O. Monzeglio, M. Giordano, P. Cassoni, D. Schiffer.

LIX° Congresso Nazionale SINch, Milano 27-30 Ottobre 2010: “Mutations of *IDH1* and *IDH2* genes in astrocytic and oligodendrocytic gliomas”, M. Mellai, **A. Piazzi**, M. Giordano, A. Comino, C. Modellini, M. Lanotte, P. Cassoni, D. Schiffer.

47° Congresso Nazionale AINP – 37 ° Congresso Nazionale AIRIC, Genova 19-21 Maggio 2011, “Significance of timing of genetic and epigenetic events in gliomagenesis”, M. Mellai, **A. Piazzi**, O. Monzeglio, P. Cassoni, G. Valente, D. Schiffer.

International Conference on Molecular Clinical Oncology, Torino 26-28 Maggio 2011, “IDH1/2 mutations and their correlations in brain tumors”, M. Mellai, V. Caldera, **A. Piazzi**, O. Monzeglio, D. Schiffer.

56th Annual Meeting of the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy, Tübingen 21-24 Settembre 2011, “*IDH1* and *IDH2* mutations in a series of 363 brain tumors”, M. Mellai, **A. Piazzi**, O. Monzeglio, V. Caldera, B. Pollo, D. Schiffer.

XIV Congresso Nazionale SIGU, Milano 13 – 16 Novembre 2011, “Identificazione di delezioni a carico del cromosoma Y nei gliomi maligni mediante MLPA”, M. Mellai, **A. Piazzi**, P. Grignani, C. Previderè, M. Giordano, D. Schiffer.

1° ANNO

XIV Congresso Nazionale AINO, Padova 4-7 Ottobre 2009, “Ipermetilazione di MGMT in relazione ad alterazioni genetiche nei gliomi di basso grado”, M. Mellai, **A. Piazzi**, O. Monzeglio, V. Caldera, L. Annovazzi, A. Comino, G. Valente, D. Schiffer.

XXII Congresso Nazionale SIGU, Torino 8-10 Novembre 2009, “Analisi della perdita di eterozigotà nei gliomi mediante microsatelliti e Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)”, M. Mellai, **A. Piazzi**, M. Giordano, P. Cassoni, D. Schiffer.

XLVI Congresso Internazionale AINP – XXXVI AIRIC, Squillace (CZ) 23-25 Maggio 2010: “Significance of *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas and their correlations”, M. Mellai, O. Monzeglio, **A. Piazzi**, E. Andreoli, D. Schiffer.

IX Meeting EANO, Maastricht 16-19 Settembre 2010, “Significance of *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas and their correlations”, M. Mellai, O. Monzeglio, **A. Piazzi**, E. Andreoli, D. Schiffer.

Pubblicazioni Scientifiche

M. Mellai, **A. Piazzi**, V. Caldera, O. Monzeglio, P. Cassoni, D. Schiffer “*IDH1* and *IDH2* mutations,

immunoistochemistry and associations in a series of brain tumors”, J Neurooncol. 2011 Epub June 4.
(Impact Factor 2.929)

Caldera V., Mellai M., Annovazzi L., **Piazz** A., Cassoni P. and Schiffer D. “Antigenic and genotypic similarity between primary glioblastomas and their derived neurospheres”, J Oncol. Epub 2011 Aug 18. (Not Yet Impact Factor)

M. Mellai, O. Monzeglio, **A. Piazz**i, V. Caldera, L. Annovazzi, P. Cassoni, G. Valente, S. Cordera, C. Mocellini, D. Schiffer “MGMT promoter hypermethylation and its associations with genetic alterations in a series of 374 brain tumors” in press on J Neurooncol. (Impact Factor 2.929)