

**Università degli studi del Molise**  
**Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute**



**Dottorato di Ricerca in**  
**Medicina Traslazionale e Clinica**

**Ciclo XXXIV**

**Settore Scientifico Disciplinare:**

**(BIO/10) BIOCHIMICA**

**(ING-IND/11) FISICA TECNICA AMBIENTALE**

**Isolamento e caratterizzazione di cellule staminali  
tumoriali di adenocarcinoma del colon-retto per  
l'investigazione di strategie terapeutiche innovative**

**Dottoranda:**  
**Ciampi Silvia**  
**Matricola 164707**

**Supervisore:**  
**Prof. Caranci Ferdinando**

**Coordinatore Dottorato:**  
**Prof. Sarchiapone Marco**

Anno Accademico 2020/2021

## INDICE

<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>4</b>
CARCINOMA DEL COLON-RETTO.....	5
MECCANISMI DI TUMORIGENESI.....	7
CELLULE STAMINALI TUMORALI.....	11
VIA DI SEGNALAZIONE DI NOTCH.....	13
MARCATORI DELLE CST NEL CARCINOMA DEL COLON-RETTO.....	14
<i>CD133</i> .....	15
<i>CD44</i> .....	17
<i>LGR5</i> .....	19
INTERAZIONE CELLULA-CELLULA E CELLULA-MATRICE.....	20
TERAPIE FARMACOLOGICHE PER IL TRATTAMENTO DEL CCR.....	22
<i>Doxorubicina</i> .....	23
<i>Berberina</i> .....	24
<b>SCOPO DEL PROGETTO.....</b>	<b>25</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>27</b>
COLTURE LINEE CELLULARI.....	28
ISOLAMENTO DELLA POPOLAZIONE STAMINALE DA HT-29 E CaCo-2.....	28
COLTURE PRIMARIE DA BIOPSIE DI METASTASI EPATICHE DI PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA DEL COLON-RETTO.....	29
TRATTAMENTI CON BERBERINA E DOXORUBICINA SULLE CST.....	29
SAGGIO BRDU.....	30
SAGGIO MTT.....	31
SAGGIO DI IMMUNOCITOCHIMICA.....	32
WESTERN BLOT.....	33
<i>Lisati totali</i> .....	33
<i>Estratti nucleari/citoplasmatici</i> .....	34
<i>Estratti vescicolari</i> .....	35
<i>Conta della concentrazione proteica</i> .....	35
<i>Preparazione dei campioni</i> .....	36
<i>Elettroforesi e trasferimento</i> .....	36
<i>Preparazione dei substrati 2D e caratterizzazione meccanica</i> .....	37
<i>Analisi statistica</i> .....	39

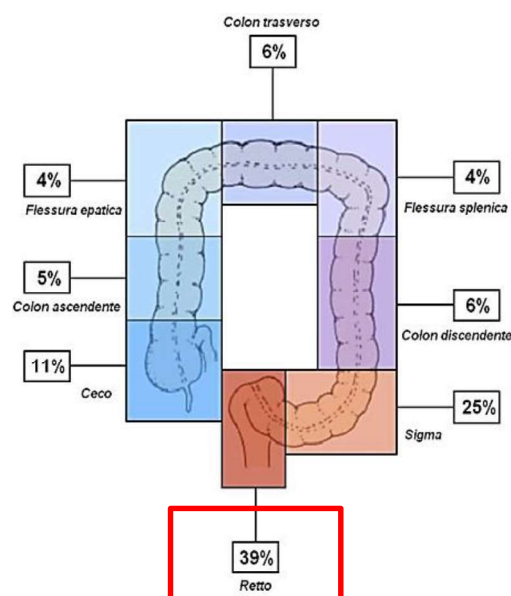
<b>RISULTATI.....</b>	<b>40</b>
CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI SULLA BASE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI MARCATORI MOLECOLARI.....	41
<i>Analisi di immunocitochimica.....</i>	42
<i>Analisi di Western Blot.....</i>	44
DIFFERENTE LOCALIZZAZIONE DI CD133 TRA LE CaCo-2 CT RISPETTO ALLE CaCo-2 CST.....	46
<i>Analisi di immunocitochimica.....</i>	46
<i>Analisi di Western Blot.....</i>	46
TRATTAMENTO DELLE HT-29 CST E DELLE CaCo-2 CST CON DOXORUBICINA, BERBERINA E L'AZIONE COMBINATA DEI DUE.....	48
<i>Saggio Brdu.....</i>	48
<i>Saggio MTT.....</i>	50
<i>Analisi di immunocitochimica.....</i>	51
<i>Analisi di Western Blot.....</i>	53
ACCUMULO DEI FRAMMENTI DI CD44 E CD133 NELLE VESCICOLE EXTRACELLULARI ISOLATE DALLE HT-29 E CaCo-2.....	56
<i>Aumento dei frammenti di CD44 e CD133 nelle vescicole extracellulari in maniera trattamento-dipendente.....</i>	57
RUOLO DELLA MATRICE EXTRACELLULARE SUL COMPORTAMENTO DELLE CST <i>IN VITRO</i> .....	58
COLTURE PRIMARIE DA BIOPSIA DI METASTASI EPATICA DA PAZIENTI CON CARCINOMA DEL COLON-RETTO.....	61
<i>Analisi di immunocitochimica.....</i>	63
<b>DISCUSSIONI.....</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>73</b>

## INTRODUZIONE

### CARCINOMA DEL COLON-RETTO

Il carcinoma del colon-retto (CCR) è al secondo posto tra i tumori più comuni nelle donne e al terzo negli uomini<sup>1</sup>. Con carcinoma colon-rettale si indica qualsiasi neoplasia avente sede tra l'inizio del cieco e il retto. Tuttavia, le sedi maggiormente colpite sono il retto (40%) e il sigma (25%), anche se a rischio è tutto l'intestino crasso (**figura 1**). L'adenocarcinoma rappresenta il 90% dei casi di CCR<sup>2</sup>.

Più del 70% dei decessi correlati al CCR sono causati da metastasi epatiche. L'intervento chirurgico può essere potenzialmente efficace, ma meno del 25% dei casi è operabile e i tassi di recidiva corrispondono al 70%. I CCR inoperabili, ricorrenti o metastatici sono generalmente trattati con chemioterapia palliativa<sup>3</sup>. Il CCR (stadio I e II) è potenzialmente curabile in presenza di una diagnosi precoce e di imminenti interventi terapeutici, ma la maggior parte dei paesi non dispone di un programma di screening che consenta la diagnosi precoce<sup>4</sup>. Ha un tasso di sopravvivenza a 5 anni compreso tra il 70% e il 90%<sup>5</sup>. Al contrario, la sopravvivenza media a 5 anni per il CCR nodulare (stadio III) e metastatico (stadio IV) è di circa il 50%-70% e 10%-14%, rispettivamente<sup>2</sup>. Ciò è principalmente attribuito all'invasione linfatica e vascolare delle cellule tumorali. L'incidenza del CCR aumenta drammaticamente dopo i 50 anni di età, con il 90% dei casi che rientrano in questa fascia di età<sup>5</sup>.



**Figura 1.** Anatomia dell'intestino crasso. Tratto da: Dionigi, Basi teoriche e Chirurgia generale - Chirurgia specialistica, 4<sup>a</sup> ed., Padova, Elsevier Masson, 2006.

Diverse sono le cause che concorrono allo sviluppo di malattia, alcune di natura estrinseca legate allo stile di vita – la dieta, il fumo, l’obesità - e altre di natura intrinseca – l’età, il genere, la familiarità, le patologie infiammatorie croniche, le lesioni precancerose e le alterazioni genetiche –. La presenza di patologie infiammatorie croniche dell’intestino, quali morbo di Crohn e retto-colite ulcerosa, così come la presenza di lesioni precancerose, quali polipi adenomatosi e/o villosi possono aumentare la probabilità di insorgenza del tumore.

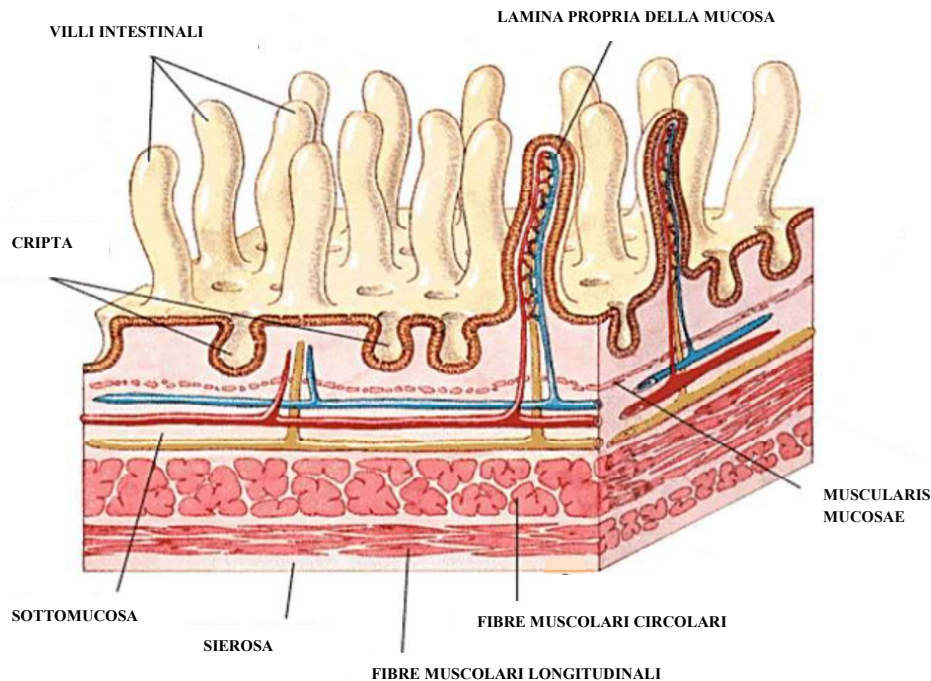
Tra le cause ereditarie ci sono le poliposi adenomatose ereditarie, tra cui l’adenomatosi poliposa familiare o FAP e quella che viene chiamata carcinoma ereditario del colon-retto su base non poliposica, detta anche HNPCC. Si tratta di malattie trasmesse da genitori portatori di specifiche alterazioni genetiche e la probabilità di trasmissione del gene alterato è di circa il 50%, indipendentemente dal sesso. Le mutazioni genetiche possono quindi essere ereditarie o acquisite e comportano alterazioni di diverse vie di trasduzione del segnale, quali ad esempio il pathway di Wnt/ $\beta$ -catenina o il pathway di Notch, implicati nel differenziamento, nella replicazione cellulare e nei meccanismi di riparazione del DNA<sup>6,7</sup>.

Le forme ereditarie di malattia sono comunque una piccola parte (15-20%), mentre l’80% dei casi è di tipo sporadico<sup>8</sup>.

<b>FATTORI DI RISCHIO</b>	
<b>ESTRINSECI</b>	<b>INTRINSECI</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentazione</li> <li>• Fumo</li> <li>• Alcol</li> <li>• Obesità</li> <li>• Corredo ormonale</li> <li>• Sedentarietà</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Età</li> <li>• Genere</li> <li>• Patologie infiammatorie croniche</li> <li>• Lesioni precancerose</li> <li>• Familiarità</li> <li>• Alterazioni genetiche: ereditarie e</li> </ul> <p><b>SPORADICHE (80% DEI CASI)</b></p>

## MECCANISMI DI TUMORIGENESI

La parete dell'intestino crasso è costituita, dall'interno verso l'esterno, dalle seguenti 4 tonache:



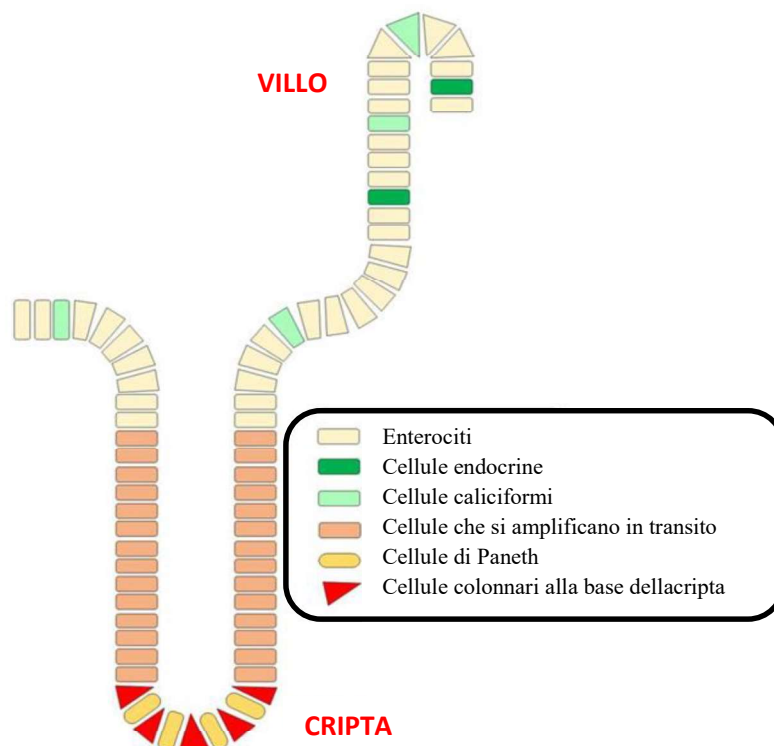
**Figura 2.** Parete dell'intestino crasso.

- tonaca mucosa, strato di rivestimento a contatto con il lume;
- tonaca sottomucosa, che contiene il plesso nervoso di Meissner;
- tonaca muscolare, con fasci muscolari per permettere i movimenti intestinali (peristalsi);
- tonaca sierosa, strato più esterno che fissa l'organo alla parete addominale.

Internamente la mucosa e la sottomucosa del colon sono sollevate nelle haustra, che si presentano come pieghe le quali circondano parzialmente il lume dell'organo. La **tonaca mucosa**, a sua volta, è suddivisa in tre strati: a) **epitelio di rivestimento**, rivolto verso il lume dell'organo; b) **lamina propria**, nella quale si trovano ghiandole e noduli linfatici e che ha funzione di sostegno dell'epitelio intestinale; c) **la muscularis mucosae**, con fasci muscolari interni circolari e fasci esterni longitudinali, che permette un movimento proprio della tonaca mucosa.

La superficie luminale del colon è costituita da un singolo strato di cellule epiteliali colonnari che sono piegate per formare sporgenze a forma di colonna all'interno del lume intestinale (**figura 3**).

Gli spazi tra queste pieghe sono noti come le cripte di Lieberkühn, unità funzionale dell'intestino<sup>9</sup>. L'epitelio del colon contiene quattro distinte linee cellulari: enterociti, cellule caliciformi, cellule endocrine e cellule di Paneth<sup>10</sup>. Le cellule colonnari alla base della cripta (CBC) sono piccole cellule indifferenziate che si pensa siano le cellule staminali dell'intestino che danno origine ai diversi tipi cellulari. Queste cellule staminali possiedono la capacità di dividersi in modo asimmetrico, dando origine a cellule figlie identiche e a cellule che si amplificano in transito che proliferano e si differenziano in enterociti, cellule caliciformi e cellule endocrine durante il loro movimento verso l'alto attraverso la cripta<sup>11</sup>. Questi tre tipi di cellule epiteliali occupano la metà superiore della cripta e la superficie luminale epiteliale. Le cellule di Paneth si differenziano a partire dalle cellule che si amplificano in transito mentre si muovono verso il basso alla base della cripta, e si trovano insieme alla popolazione di cellule staminali/cellule CBC<sup>9</sup>.

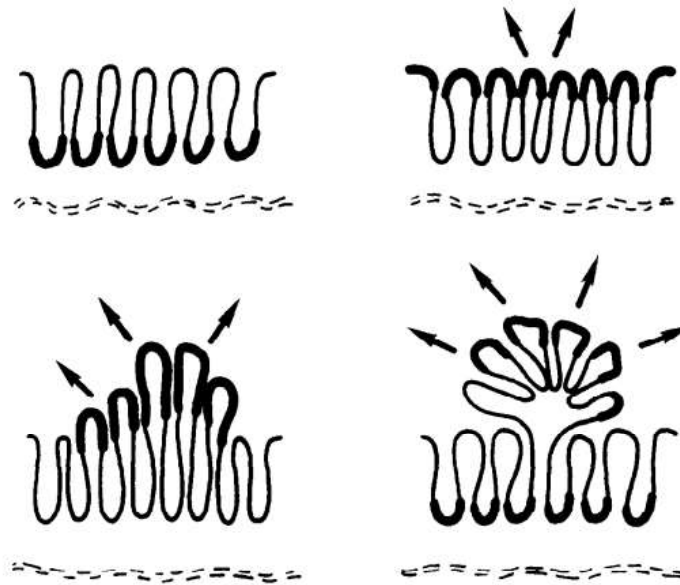


**Figura 3.** Organizzazione cellulare dell'epitelio del colon. Le cellule colonnari alla base della cripta, cellule staminali intestinali, si dividono in una cellula staminale figlia identica e

una cellula che si amplifica in transito. Quest'ultima si divide rapidamente per un numero limitato di volte, dando origine ad un gruppo di cellule che si differenziano nei quattro tipi di cellule epiteliali: enterociti, cellule caliciformi, cellule endocrine e cellule di Paneth che migrano verso l'alto attraverso la cripta. Gli enterociti, le cellule caliciformi e le cellule endocrine rimangono nell'epitelio luminale, mentre le cellule di Paneth ritornano alla base della cripta<sup>10</sup>.

Le cellule di Paneth contribuiscono al mantenimento della nicchia cellulare staminale producendo barriere di difesa della mucosa, modulando la microflora intestinale e producendo fattori di crescita e altre molecole regolatrici<sup>9,12,13</sup>. L'epitelio del colon normale è formato da cripte uniformemente distanziate. Le cripte nel CCR mostrano un'architettura caotica caratterizzata da cripte ramificate, forma irregolare e una grande quantità di stroma desmoplastico. La tumorigenesi si verifica nelle cripte dell'epitelio del colon dal basso verso l'alto attraverso mutazioni dirette delle CBC o cellule progenitrici, durante il processo di differenziamento<sup>14</sup>. Alcune indagini basate su questo concetto ipotizzano che la neoplasia adenomatosa abbia un'origine nelle profondità delle cripte intestinali, con un epitelio trasformato che “fluisce” verso l'alto e perifericamente fino a sostituire l'epitelio normale<sup>15</sup>. Dato che il periodo di migrazione delle cellule dalla base della cripta alla superficie luminale è di 4-6 giorni, una prima ipotesi è stata che la crescita tumorale sia guidata da una maggiore proliferazione cellulare nell'epitelio superficiale<sup>16</sup>. Infatti, durante la tumorigenesi precoce, le cellule alla base della cripta appaiono normali mentre le prime cellule displastiche si trovano sulla superficie epiteliale<sup>14</sup>. Queste cellule displastiche presentano un'alterata espressione del gene che codifica per la proteina APC (poliposi adenomatosa coli) e altri geni associati a tumori. Una seconda ipotesi è che le cellule dall'aspetto normale, già trasformate, migrano verso l'alto dalla base della cripta e si addensano sulla superficie della mucosa<sup>17</sup>. Un numero maggiore di nuove cripte rispetto alla base della cripta è stato osservato nell'epitelio di polipi e tumori. Ciò è stato spiegato dal processo di invaginazione dell'epitelio superficiale a causa di un accumulo di cellule neoplastiche (**figura 4**).





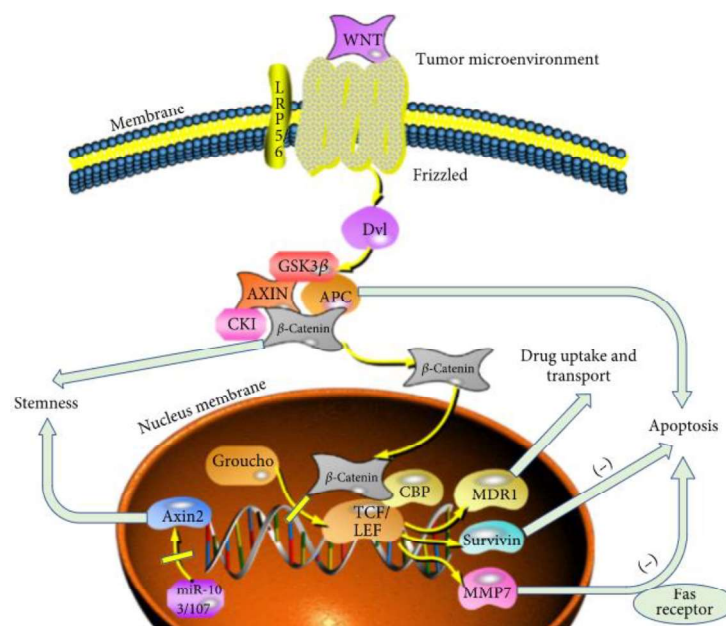
**Figura 4.** Rappresentazione della formazione di un polipo. Le linee sottili rappresentano l'epitelio differenziato, le linee spesse l'epitelio proliferativo<sup>17</sup>.

La maggior parte delle alterazioni geniche si trovano, quindi, a livello di un gene oncosoppressore localizzato sul cromosoma 5 in q21-22 e che codifica per la proteina APC (70-80% dei casi sporadici di CCR). In condizioni fisiologiche, la proteina APC favorisce la migrazione e l'adesione cellulare e prende parte alla via di trasduzione del segnale Wnt/ $\beta$ -catenina. Il ruolo principale di APC è quello di modulare i livelli citoplasmatici di  $\beta$ -catenina: quando la proteina APC si trova localizzata nel citosol è in grado di legare, attraverso domini proteici specifici, l'axina, la  $\beta$ -catenina e la GSK-3B. Il complesso enzimatico APC/axina/GSK-3B va a fosforilare la  $\beta$ -catenina, che a sua volta viene ubiquitinata e di conseguenza destinata al segnale di degradazione da parte dei proteasomi<sup>18</sup>. Quando Wnt si lega al suo recettore di membrana Frizzled, si scatenano una serie di eventi intracellulari che portano ad un'inattivazione della proteina APC, che non riesce più ad interagire con la  $\beta$ -catenina con conseguente accumulo di  $\beta$ -catenina nel citosol (il 50% dei casi di CCR è causata da mutazioni a carico della  $\beta$ -catenina). Successivamente, la  $\beta$ -catenina riesce a traslocare nel nucleo e va a legarsi a fattori trascrizionali, come TCF/LEF e attivare la trascrizione di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, cMyc e ciclinaD<sup>19</sup>. La via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, essenziale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare e lo sviluppo embrionale, risulta essere associata alla

proliferazione delle cellule tumorali, all'apoptosi, all'invasione, alla staminalità e alla resistenza alla chemioterapia<sup>20</sup> (**figura 5**). La  $\beta$ -catenina è anche un componente essenziale del complesso di adesione cellulare della E-caderina<sup>21</sup>, una delle principali proteine coinvolte nelle adesioni cellula-cellula<sup>22</sup>, che sono di fondamentale importanza nella formazione e mantenimento dei tessuti epiteliali<sup>23</sup>.

Un'altra importante alterazione genica è quella a carico dell'oncogene K-RAS in circa il 40% dei casi con tumori al colon-retto<sup>24</sup>.

Il gene K-RAS è localizzato sul cromosoma 12 e codifica per una proteina che fa parte della super-famiglia delle proteine RAS con attività GTP-asica<sup>25</sup>. La proteina K-RAS è una proteina di membrana che, se attivata, scatena una serie di eventi intracellulari che portano alla trascrizione di geni che codificano per proteine coinvolte nella proliferazione cellulare<sup>26</sup>. Altre mutazioni importanti sono state trovate a carico di geni quali TP53, SMAD2 e 4, PTEN, PIK3CA, TGF $\beta$ RII<sup>27</sup>.

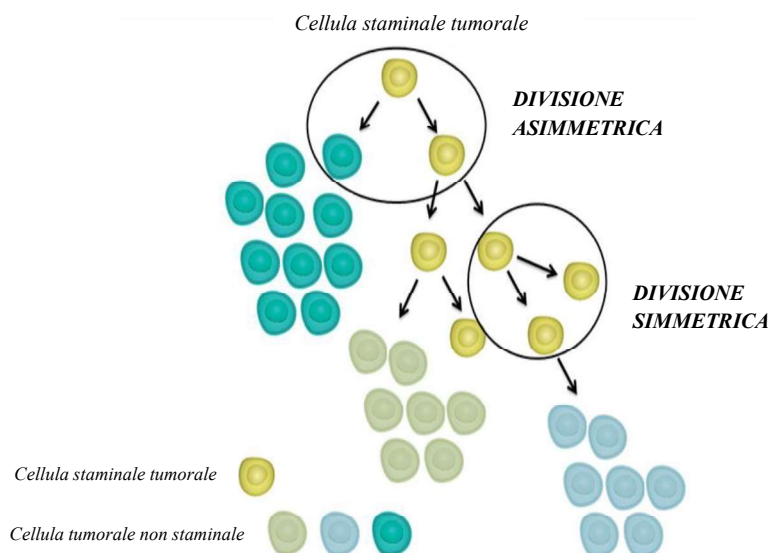


**Figura 5.** Ruolo della via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina nella chemioresistenza del cancro del colon-retto<sup>20</sup>.

## CELLULE STAMINALI TUMORALI

Diverse evidenze in letteratura riportano che le cellule staminali tumorali (CST) svolgano un ruolo centrale nella progressione tumorale. Queste cellule si dividono asimmetricamente, generando una cellula figlia staminale identica e una cellula figlia che va incontro ad un processo di differenziamento (**figura 6**). Le CST perdono il controllo

dei meccanismi di replicazione e questo porta a tumorigenesi<sup>9</sup>. Le CST sono così definite sia per la loro capacità di auto-rinnovamento ma anche perché generano cellule tumorali differenziate, favoriscono lo sviluppo tumorale e una proliferazione cellulare incontrollata, causando una replicazione cellulare anormale ma lenta, che le rende resistenti alle terapie<sup>9,28,29</sup>.



**Figura 6.** Modello gerarchico di sviluppo del tumore. Questo modello propone che le varie diverse popolazioni di cellule che compongono i tumori derivino in definitiva da una CST.

Le CST contribuiscono alla propagazione tumorale, poiché risiedono in uno stato di quiescenza mitotica, in cui permangono come CST residue "dormienti". Dopo un periodo di latenza, le CST rientrano nel ciclo cellulare e producono nuove cellule tumorali, causando le recidive<sup>30</sup>. Le CST sono la controparte maligna delle normali cellule staminali (CSN) e il loro momentaneo rientro nel ciclo cellulare favorisce, strategicamente, il mantenimento della staminalità e la progressione tumorale. Le CST e la loro progenie presentano una grande variabilità, probabilmente a causa delle mutazioni nei geni coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA, le quali possono aver inizialmente contribuito alla carcinogenesi, con la formazione di tumori eterogenei. La formazione tumorale, che è il risultato di un'attività incontrollata delle CST, comporta che le cellule tumorali differenziate incapaci di avviare lo sviluppo tumorale o di auto-rinnovarsi, hanno comunque ereditato la capacità di proliferare in un modo incontrollato<sup>9</sup>. Sono state proposte due teorie per spiegare come nascono le CST:

1. da mutazioni oncogeniche che si accumulano all'interno di cellule staminali adulte normali e che portano alla loro proliferazione incontrollata<sup>31</sup>.

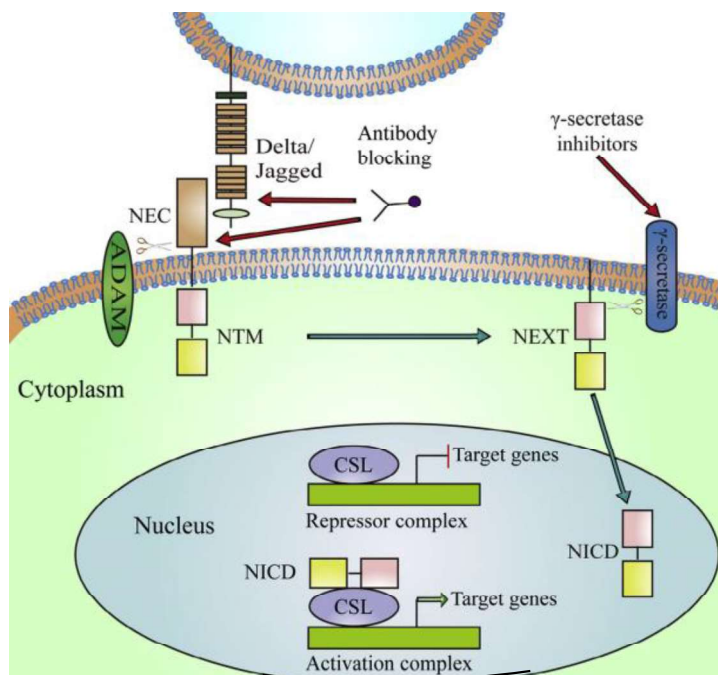
2. de-differenziazione cellulare in uno stato simil-staminale, che in una cellula tumorale determinerebbe la formazione della CST<sup>27,30</sup>.

La rapida attivazione delle cellule quiescenti è consentita da vie di segnalazione che mantengono e regolano le CST in uno stato attivo<sup>32</sup>. Ad esempio la deregolazione della via di segnalazione di Notch può contribuire alla tumorigenesi, alterando i meccanismi di auto-rinnovamento delle CSN<sup>33</sup> e inducendo la formazione e il mantenimento delle CST<sup>34</sup>.

## VIA DI SEGNALAZIONE DI NOTCH

La via di segnalazione Notch è un sistema di segnalazione cellulare altamente conservato. Esistono quattro diversi recettori Notch, denominati NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 e NOTCH4. Il recettore Notch è un etero-oligomero composto da una voluminosa porzione extracellulare associata con un'interazione non covalente e calcio-dipendente a una porzione più piccola che comprende una parte extracellulare, un'elica transmembrana a singolo passo e una parte intracellulare. Nella porzione extracellulare, questa proteina presenta numerosi domini ricchi di cisteina definiti "domini EGF-simili". In tali domini, inoltre, il recettore si presenta glicosilato. L'interazione dei ligandi (Delta e Jagged) con il dominio extracellulare del recettore inducono la scissione proteolitica e il rilascio del dominio intracellulare, che entra nel nucleo per modificare l'espressione genica. Una volta che il dominio extracellulare interagisce con un ligando, una metalloproteasi della famiglia ADAM chiamata ADAM10, scinde la proteina in un sito appena fuori dalla membrana<sup>35</sup>. Il ligando più il dominio extracellulare del recettore vengono endocitati dalla cellula che esprime il ligando. Dopo questo primo taglio proteolitico, un enzima chiamato  $\gamma$ -secretasi scinde la parte rimanente della proteina Notch appena all'interno della membrana cellulare della cellula che esprime il recettore. Questo rilascia il dominio intracellulare della proteina Notch, che poi si sposta nel nucleo, dove può regolare l'espressione genica attivando il fattore di trascrizione CSL (**figura 7**). Tale recettore è particolarmente espresso in cellule dotate di potenzialità staminale e va a determinare il differenziamento, nonché una serie di processi tra cui la funzione e lo sviluppo dei neuroni, l'angiogenesi, l'espansione delle staminali emopoietiche durante lo sviluppo dell'osso. È inoltre espresso costitutivamente in diversi tumori<sup>36</sup>. La via di segnalazione di Notch svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento del normale epitelio intestinale<sup>37</sup>, promuovendo la proliferazione delle cellule staminali nella cripta e regolando la

differenziazione delle cellule epiteliali del colon. Pertanto, la segnalazione di Notch regola la progressione del ciclo cellulare delle cellule progenitrici della cripta<sup>38</sup>. In letteratura è riportata un'attivazione aberrante della segnalazione di Notch nel CCR, in particolare il ligando di Notch “Jagged” è espresso a un livello significativamente più alto nel CCR rispetto alla mucosa del colon normale. L'attivazione del segnale di Notch può sovraregolare molte altre vie di segnalazione che favoriscono la sopravvivenza cellulare. La segnalazione PI3K/AKT, c-Myc ed EGFR sono sovraregolate dall'attivazione del segnale di Notch<sup>39,40,41</sup>.



**Figura 7.** La segnalazione di Notch inizia dal legame del ligando al recettore, che subisce una scissione proteolitica in due fasi da parte delle proteasi della famiglia ADAM e della  $\gamma$ -secretasi, rilasciando il dominio intracellulare di Notch (IC). Il dominio IC trasloca nel nucleo dove si lega a CSL e converte il complesso da repressore a attivatore dei geni bersaglio<sup>36</sup>.

## MARCATORI DELLE CST NEL CARCINOMA DEL COLON-RETTO

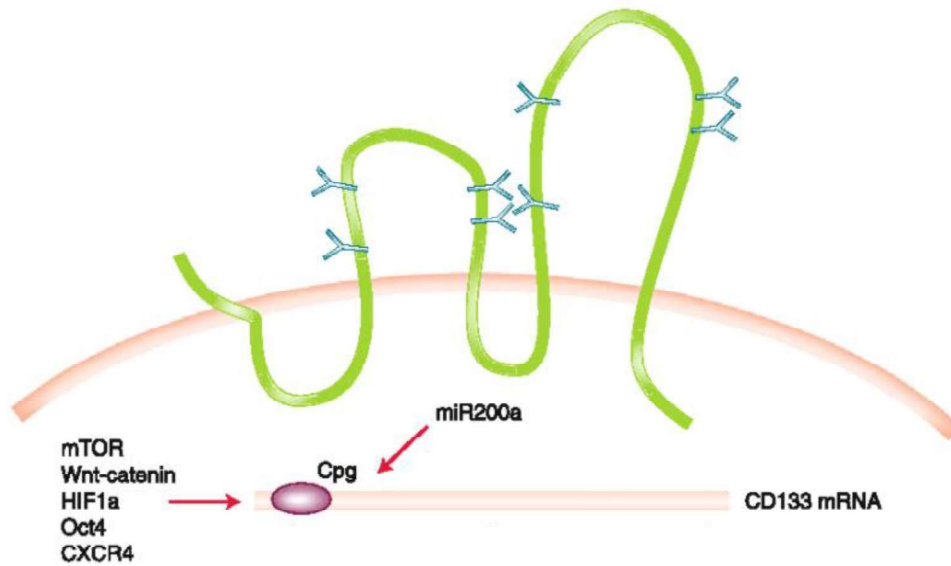
Lo studio delle CST è reso complesso per diversi motivi, tra cui lo scarso numero di CST, l'eterogeneità e la variabilità delle cellule a seconda del tipo tumorale. Sono stati identificati alcuni geni fondamentali per modulare la pluripotenza delle CST e marcatori relativamente specifici per caratterizzarle e isolarle nei tessuti tumorali. Geni specifici quali OCT4, SOX2 e NANOG svolgono un ruolo dominante nella regolazione della

pluripotenza<sup>42,43</sup>, in quanto fattori di trascrizione che autoregolano la loro stessa espressione legandosi alle proprie regioni promotrici<sup>42</sup>. Marcatori come c-Myc, STAT3 (trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione) e l'aldeide deidrogenasi (ALDH) sono osservati in diversi tipi tumorali, nelle cellule staminali normali, nelle CST e nella chemioresistenza. Alcuni marcatori hanno una rilevanza specifica nel CCR, tra cui CD133, CD44 e il recettore accoppiato alla proteina G 5 ricco di leucina (LGR5)<sup>10</sup> e sono spesso utilizzati per individuare e caratterizzare le CSC isolate da tessuti tumorali.

### *CD133*

La famiglia del gene *prominina* nei mammiferi contiene due membri di glicoproteine con più passaggi transmembrana (*prominina-1* e *prominina-2*), che sono specificamente espressi sui microvilli e altre protrusioni della membrana plasmatica. Entrambe le molecole di *prominina* interagiscono con il colesterolo della membrana plasmatica e sono maggiormente espresse in corrispondenza dei rafts, microdomini lipidici della membrana plasmatica ricchi in colesterolo e sfingolipidi<sup>44</sup>.

CD133, noto anche come *prominina-1*, è una glicoproteina che nell'uomo è codificata da 27 esoni del gene *PROM1* situati sul cromosoma 4, sottoposti a splicing alternativo<sup>45</sup>. Sono state identificate almeno 7 isoforme della proteina (di circa 825-865 amminoacidi) e sebbene il loro ruolo sia poco chiaro, possono svolgere diverse funzioni, in quanto mostrano un differente dominio intracellulare che gli permette di interagire con diverse proteine citoplasmatiche<sup>46</sup>. Otto potenziali siti di glicosilazione sono stati identificati sui domini extracellulari e le forme glicosilate hanno una massa molecolare di ~ 115-130 kDa<sup>47</sup>. CD133 è concentrato nelle evaginazioni di membrana alla base dei segmenti esterni delle cellule fotorecetrici a bastoncello e in assenza di CD133, si verifica la degenerazione dei fotorecettori<sup>48,49</sup>. CD133 è espresso sia sulle cellule epiteliali sia sulle cellule non epiteliali, mentre la *prominina-2* è presente solo sulle cellule epiteliali e probabilmente sostituisce funzionalmente la *prominina-1* in tessuti diversi dalla retina<sup>50</sup>. È caratterizzata da un dominio N-terminale che si estende nello spazio extracellulare e un dominio C-terminale che risiede nel compartimento intracellulare. La proteina è costituita da cinque segmenti transmembrana, con il primo e il secondo segmento e il terzo e il quarto segmento collegati da anelli intracellulari mentre il secondo e il terzo e il quarto e il quinto segmento transmembrana sono collegati da anelli extracellulari (**figura 8**).



**Figura 8.** CD133 è espresso sia nei tessuti normali sia nelle CST. L'espressione di CD133 è dovuta alla mancanza di metilazione dell'isola CpG ed è regolata da diverse vie di segnalazione, tra cui miR-200a, che funge da promotore di staminalità attraverso la via Wnt / $\beta$ -catenina<sup>51</sup>.

Queste osservazioni suggeriscono che CD133, che lega il colesterolo e in particolare i gangliosidi all'interno di uno specifico microdominio di membrana, possa svolgere un ruolo di organizzazione delle protrusioni cellulari della membrana plasmatica<sup>52</sup>.

Diverse evidenze in letteratura mettono in discussione l'utilizzo di CD133 come marcatore delle CSN e delle CST e questo dubbio è stato in parte sollevato a causa dei risultati contrastanti ottenuti con l'anticorpo monoclonale AC133 (mAb) ampiamente utilizzato, che riconosce un particolare epitopo all'interno di CD133<sup>53</sup>. CD133 subisce diverse modifiche post-traduzionali, come l'N-glicosilazione, e conoscere la struttura degli N-glicani all'interno di una data glicoproteina è importante non solo da un punto di vista funzionale ma anche per l'utilizzo di anticorpi specifici<sup>54</sup>. I livelli di glicosilazione di CD133 potrebbero cambiare a seconda del tessuto di interesse e/o dello stato di differenziazione cellulare e un cambiamento strutturale dei glicani è confermato nella progressione tumorale<sup>55</sup>.

CD133 modula, quindi, la composizione lipidica della membrana plasmatica e probabilmente questo comporta i cambiamenti del metabolismo tumorale<sup>56</sup>. CD133 è considerato un marcatore putativo delle CST nel CCR, poiché sembra favorire la propagazione delle cellule tumorali<sup>57,58</sup>. La percentuale di cellule CD133+ è aumentata

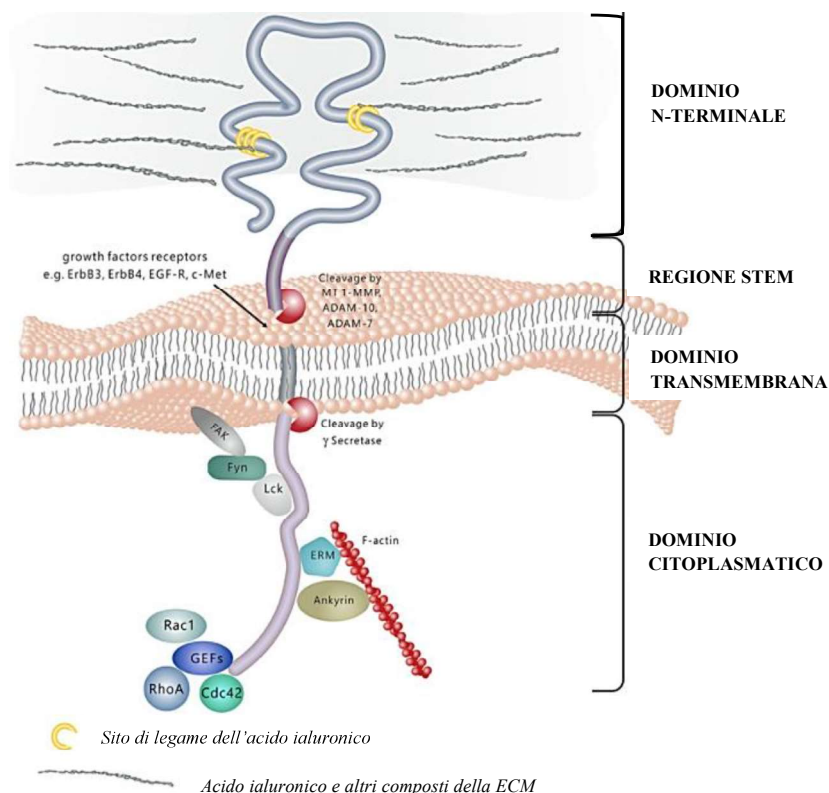
nei pazienti con poliposi adenomatosa familiare e durante lo sviluppo del carcinoma, poiché le modificazioni genetiche ed epigenetiche alterano il profilo di espressione di CD133<sup>59</sup>. CD133 è considerato, quindi, un marcatore delle CST poiché le cellule CD133+ mostrano un potenziale tumorigenico e metastatico che le cellule CD133- non possiedono. Le cellule tumorali con un'aumentata espressione di CD133 e un alterato stato di glicosilazione sembrano, quindi, essere più vicine ad un fenotipo simil-staminale tumorale<sup>60,61</sup>.

#### *CD44*

La proteina CD44 è una proteina a singolo passo transmembrana, monomerica, altamente glicosilata che lega l'acido ialuronico e altre glicoproteine della matrice extracellulare<sup>62</sup>. È principalmente una molecola di adesione intercellulare espressa su linfociti e leucociti. La molecola è composta da 177 amminoacidi e si divide in 4 domini: uno extracellulare (EC) che lega l'acido ialuronico, uno transmembrana con funzione di ancoraggio, un dominio intermedio tra i due che varia in lunghezza a seconda degli esoni e uno intracellulare con varie funzioni (**figura 9**). Il dominio EC è lungo 157 amminoacidi e ha 3 ponti disolfuro e numerosi siti di O- e N- glicosilazione a cui sono legati fino a duecento residui glucidici di vario tipo e con vari legami, tanti da mascherare quasi del tutto la proteina di base e modificarne l'affinità per i vari ligandi<sup>63</sup>. Un altro importante aspetto che modifica significativamente l'affinità è la possibilità di avere fino a 10 splicing alternativi, la proteina base viene detta CD44H (H sta per "hematopoietic" e si trova in diversi tessuti) o CD44s, mentre le isoforme che si indicano con CD44v mostrano affinità minore per l'acido ialuronico e sono selettivamente espresse sulle cellule epiteliali<sup>64</sup>. Il legame di CD44 con l'acido ialuronico, componente della matrice extracellulare (ECM), avviene in particolari zone quali i tessuti connettivi embrionali e il contorno di lesioni cancerose invasive e questa interazione non ha solo funzione di ancoraggio, ma fa sì che la proteina trasduca dei segnali all'interno della cellula con conseguenze variabili a seconda del tipo cellulare. Se il dominio extracellulare CD44 lega principalmente l'acido ialuronico, il dominio transmembrana guida l'adesione linfocitaria e il dominio intracellulare (CD44-ICD) si localizza a livello nucleare e modula i processi di trascrizione<sup>65</sup>. Il taglio proteolitico di CD44 è mediato da una metalloproteasi di membrana (MT1-MMP) e da  $\gamma$ -secretasi, il cui taglio avviene nella regione intramembrana con conseguente rilascio di due prodotti di scissione di dimensioni ~25 e



~16 kDa<sup>64</sup>. CD44 è un marcatore delle CST nel CCR e la sua funzione è quella di favorire le interazioni cellula-cellula, l'adesione del citoscheletro alla matrice extracellulare e la migrazione cellulare<sup>66,67</sup>. La trascrizione di CD44 è attivata dalla via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina e la sua sovraespressione è un evento precoce nella trasformazione dell'adenoma coloretale a carcinoma<sup>66</sup>. L'aumentata espressione di CD44 promuove la tumorigenesi e l'espansione clonale<sup>68</sup>, infatti è sufficiente l'iniezione di sole 100 cellule CD44+ per indurre il tumore in topi nudi e le singole cellule CD44+ formano tumorsfere con caratteristiche di staminalità. Evidenze in letteratura mostrano che le cellule CD44+/CD24-/CD133- formano tumori del colon più aggressivi, eliminando la necessità di CD133 per iniziare il tumore. È riportato, inoltre, che le cellule CD133+ hanno una bassa espressione di CD44 e si ipotizza che la popolazione CD133+ può dare origine ad un più aggressivo sottogruppo di cellule CD133- che conserva la capacità di iniziare i tumori<sup>69</sup>.

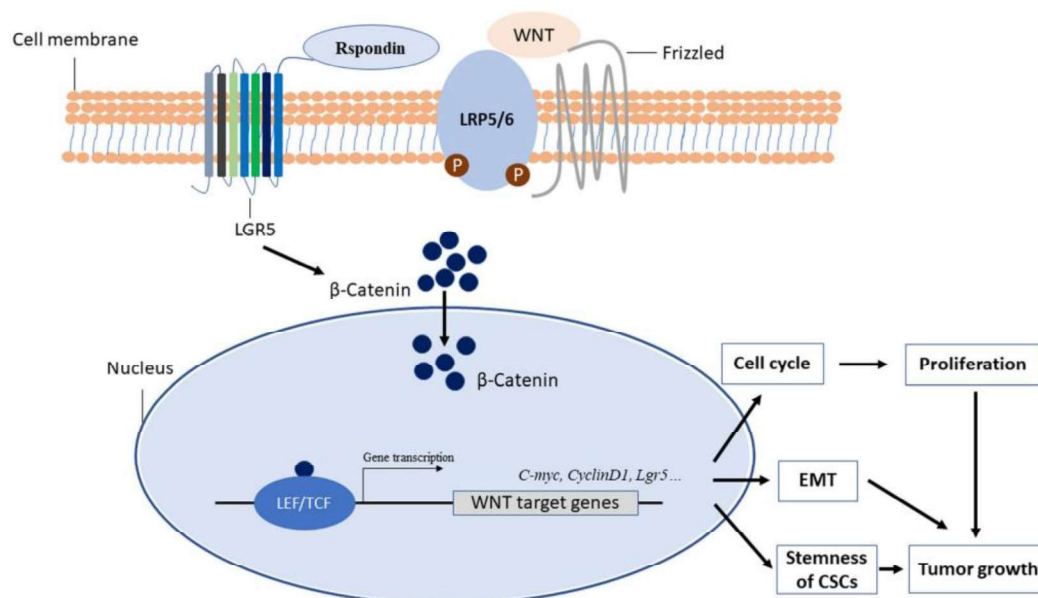


**Figura 9.** Struttura e segnalazione della proteina CD44. Il dominio extracellulare N-terminale può legare vari ligandi, tra cui l'acido ialuronico, glicoproteine e proteoglicani della ECM, fattori di crescita, citochine e metalloproteasi della matrice. A causa della scissione proteolitica all'interno della regione “stem” intermedia, il dominio extracellulare viene rilasciato nello spazio

extracellulare, il dominio transmembrana stabilizza la molecola nella membrana plasmatica e il dominio citoplasmatico guida la trasduzione del segnale attraverso il legame con diverse molecole, tra cui componenti citoscheletriche e chinasi<sup>70</sup>.

### *LGR5*

Il recettore accoppiato alla proteina G 5 (LGR5) ricco di leucina è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene LGR5, situato sul cromosoma 12 in posizione 12q22-q23. LGR5 è un membro delle proteine **del recettore GPCR** di classe A. **Le proteine R-spondina** sono i ligandi biologici di LGR5<sup>71</sup>. LGR5 è espresso in una vasta gamma di tessuti come nel muscolo, nella placenta, nel midollo spinale e nel cervello e in particolare è considerato un biomarcatore di cellule staminali adulte in alcuni tessuti. Contiene ~ 907 amminoacidi e sette domini transmembrana. Dopo la traduzione, il peptide segnale (aminoacidi 1-21) viene separato e il peptide maturo (aminoacidi 22-907) inserisce il suo dominio transmembrana nel **traslocone** prima del confezionamento verso la membrana plasmatica. LGR5 è un membro della via di segnalazione Wnt. Il legame con la R-spondina induce l'internalizzazione di LGR5. LGR5 cointernalizza anche con LRP6 e Frizzled attraverso una via clatrina-dipendente per formare un complesso ternario dopo il legame con il ligando Wnt<sup>72</sup> (**figura 10**). Pertanto, l'interazione iniziale con il suo ligando e altri recettori legati alla membrana è cruciale nella segnalazione di Wnt. LGR5 è espresso sulle cellule **CBC**<sup>9</sup>. Le cellule LGR5+ caratterizzano le CBC per la loro capacità di differenziarsi in tutti i tipi cellulari dell'epitelio del colon entro 60 giorni dalla messa in coltura *in vitro*<sup>9,73</sup>. Le cellule LGR5+ si trovano in prossimità delle cellule di Paneth che promuovono il rilascio di fattori di crescita e altre molecole fondamentali per il mantenimento delle cellule staminali tumorali alla base della cripta, questo conferma la natura staminale della popolazione LGR5+. Le cellule LGR5+ favoriscono la crescita tumorale e sono causa di recidive<sup>74</sup>.



**Figura 10.** Progressione tumorale indotta da LGR5 attraverso l'attivazione della via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina. L'R-spondina attiva LGR5 e, una volta attivata, la proteina LGR5 recluta il complesso recettore LRP-Frizzled, che si lega ai ligandi di Wnt, rinforzando il segnale di Wnt dopo la fosforilazione di LRP5/6. Ne consegue l'accumulo di  $\beta$ -catenina, che viene traslocata nel nucleo, inducendo l'espressione di vari geni bersaglio di Wnt (come C-myc, Ciclina D1, Lgr5), attraverso l'attivazione dei fattori di trascrizione TCF/LEF. Questo porta alla progressione tumorale a causa dell'aumentata proliferazione cellulare, della transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) e del mantenimento della staminalità delle CST<sup>72</sup>.

## INTERAZIONE CELLULA-CELLULA E CELLULA-MATRICE

Il microambiente tumorale è ampiamente implicato nella tumorigenesi perché ospita le cellule tumorali che interagiscono con le cellule circostanti per influenzare lo sviluppo e la progressione del tumore<sup>75</sup>. Il microambiente tumorale comprende oltre ai vasi sanguigni e linfatici, le cellule immunitarie, i fibroblasti, le molecole di segnalazione e la ECM. La ECM è costituita da una complessa miscela di macromolecole strutturali e funzionali e svolge un ruolo importante nella morfogenesi dei tessuti e nel mantenimento della struttura e della funzione cellulare e tissutale<sup>76</sup>. L'ECM è composta da diverse proteine (proteine strutturali come collagene ed elastina; proteine specializzate come fibrillina, fibronectina, laminina; proteoglicani e glucosamminoglicani quali ialuronani, condroitinsolfati, eparansolfati) e polisaccaridi, che si aggregano in un reticolo organizzato in maniera compatta e interagisce con la superficie delle cellule che l'hanno prodotta e di quelle circostanti<sup>77</sup>. Se fino a qualche tempo fa si pensava che l'ECM

servisse principalmente da impalcatura relativamente inerte in grado di stabilizzare la struttura fisica dei tessuti, è ormai ampiamente dimostrato che l'ECM rappresenta il substrato su cui tutte le cellule dei tessuti possono aderire, migrare, proliferare e differenziarsi, e che ne influenza inoltre la sopravvivenza, la forma e la funzione. Infatti, le macromolecole dell'ECM sequestrano fattori di crescita e controllano fenomeni fisiologici, quali la morfogenesi, fisiopatologici, quali la guarigione delle ferite, e patologici, quali l'invasione e la metastatizzazione tumorale. Gli approcci all'ingegneria tissutale si concentrano sulla necessità di fornire segnali alle popolazioni cellulari per promuovere la proliferazione e la differenziazione cellulare<sup>76</sup>.

Un ruolo importante nella comunicazione intercellulare è svolto dalle vescicole extracellulari (EV). Le EV sono nano- e micro- particelle lipidiche, contenenti una grande varietà di molecole tra cui proteine, peptidi, lipidi e acidi nucleici (tra cui mRNA, miRNA, ncRNA)<sup>78</sup>. Queste vescicole sono potenzialmente prodotte da tutti i tipi cellulari e secrete nell'ambiente extracellulare, sia in condizioni fisiologiche che patologiche e trasportano il loro contenuto alle cellule adiacenti ma anche a tessuti distanti tra loro. Possono essere classificate, sulla base delle loro dimensioni e dei meccanismi di biogenesi, in: esosomi (comprese fra i 50-150 nm di origine endocitica), microvescicole (comprese tra i 100-1000 nm e rilasciate da invaginazioni della membrana cellulare plasmatica) e corpi apoptotici (compresi tra 1-5 µm rilasciati dalle cellule durante il processo apoptotico di morte cellulare programmata)<sup>79</sup>. Gli esosomi e le microvescicole rappresentano i due sottotipi principali. Le EV di varia origine possono essere circolanti e isolate da diversi fluidi biologici, tra cui il sangue, l'urina, la saliva e la loro composizione e contenuto rimanda alle cellule progenitrici da cui hanno origine<sup>80,81</sup>. Le EV isolate dai fluidi biologici possono, quindi, essere considerate dei biomarcatori per la diagnosi e il monitoraggio di diverse patologie tra cui il tumore.

Le EV sono state considerate, negli ultimi tempi, un nuovo e innovativo sistema per la veicolazione di agenti diagnostici e terapeutici<sup>82</sup> e infatti rispetto alle nanoparticelle sintetiche, mostrano dei vantaggi quali: la facile penetrazione attraverso le barriere biologiche, l'internalizzazione in cellule riceventi specializzate, il ridotto accumulo aspecifico nei tessuti, la biocompatibilità e un minor riconoscimento dalle cellule fagocitarie come materiale estraneo da eliminare<sup>83</sup>. La presenza, infine, sulla loro superficie di specifiche proteine e recettori di membrana, le rende capaci di agire selettivamente su cellule e tessuti bersaglio specifici<sup>84</sup>.

## **TERAPIE FARMACOLOGICHE PER IL TRATTAMENTO DEL CCR**

La resezione chirurgica rappresenta il trattamento d'elezione dei tumori del colon-retto localizzati, in quanto circa l'80% dei pazienti si presenta alla diagnosi con malattia resecabile radicalmente. Tuttavia, il 30-40% dei casi sviluppa una recidiva a distanza di 2-3 anni o comunque entro i primi 5 anni dall'intervento<sup>85</sup>. La somministrazione di chemioterapia e/o radioterapia, prima o dopo intervento chirurgico, rappresenta un ulteriore trattamento del CCR<sup>86</sup>. Tuttavia, la terapia standard maggiormente utilizzata per il CCR è costituita da due possibili schemi di chemioterapia, uno a base di 5-fluorouracile (5-FU) e l'altro di capecitabina<sup>87</sup>. La chemio-terapia effettuata post-intervento ha una funzione adiuvante e ha lo scopo di eliminare eventuali cellule cancerose per prevenire il rischio di recidiva. Un trattamento innovativo, che sostituisce l'intervento chirurgico, è la termoablazione che consiste nell'ablazione tumorale locale con alte o basse temperature<sup>88</sup>. Differenti tecnologie di ablazione termica sono disponibili, tra cui l'ablazione a radiofrequenza, l'ablazione a microonde (MWA), a laser e la crioablazione. Ci sono prove crescenti sul ruolo dell'ablazione percutanea in pazienti con metastasi epatiche da CCR<sup>89</sup>. Si tratta di una terapia mini-invasiva che garantisce una più accurata valutazione dello stadio tumorale e un'azione più efficace, senza il rischio di lesione alle strutture circostanti. La termoablazione può risultare efficace in pazienti in cui è rischioso asportare chirurgicamente il tumore. Quindi, le tecniche ablativo offrono, rispetto alla resezione, un'alternativa a basso rischio con funzioni non solo palliative ma curative. La chirurgia, la radioterapia, la chemioterapia e le terapie di supporto, tra le quali la termoablazione, non scongiurano il rischio di recidiva poiché inefficaci nell'eliminare la popolazione staminale tumorale, responsabile della ricomparsa della malattia a distanza di molto tempo dalla sua remissione. Risulta necessario studiare nuove terapie. La nanomedicina ha acquisito, negli ultimi anni, un ruolo sempre più rilevante in ambito diagnostico, terapeutico e di follow-up<sup>90</sup>. Consiste nell'utilizzo di nanoparticelle (diametro compreso tra 1 e 100 nm) e nuove tecnologie per la diagnosi e per la somministrazione di farmaci<sup>91</sup>. Tra i più comuni tipi di nanoparticelle si possono riportare: nanoparticelle polimeriche, trasportatori molecolari a base di lipidi (come micelle e liposomi), nanoparticelle d'oro e nanoparticelle magnetiche<sup>92</sup>. Le nanoparticelle assumono un ruolo fondamentale nei trattamenti target-specifici. Le nanoparticelle riconoscono dove rilasciare il farmaco per mezzo di 4 diversi meccanismi: tramite

un'individuazione passiva o attiva dell'obiettivo, per specificità del pH e/o della temperatura<sup>93</sup>.

- Targeting passivo: inglobamento “involontario” della particella che viaggia attraverso la rete vascolare della zona tumorale, questa viene intrappolata e si accumula nell'area patologicamente alterata.
- Targeting attivo: l'individuazione dell'obiettivo avviene in modo attivo da parte della nanoparticella munita di moduli superficiali di riconoscimento come ligandi e anticorpi, i quali permettono al nanovettore di essere riconosciuto come organismo biologico ed essere quindi assorbito dalla cellula.
- Specificità del pH: le nanoparticelle sono in grado di rilasciare il farmaco solo se si trovano in ambienti con un pH specifico, come le zone tumorali, solitamente più acide del normale (pH pari a circa 6.8 rispetto al 7.4 dei tessuti sani). In questi ambienti, il farmaco viene rilasciato a causa della degradazione strutturale del nanocarrier ad opera dell'acidità dell'ambiente, lasciando così intatti tutti gli ambienti sani con pH neutro o leggermente basico.
- Specificità della temperatura: le nanoparticelle rilasciano il farmaco ad una determinata temperatura. Analogamente a quanto accade per il pH, le zone tumorali sono solitamente ad una temperatura più elevata rispetto ai tessuti sani.

Oltre alla nanomedicina, diversi studi hanno focalizzato la loro attenzione sull'utilizzo di sostanze naturali derivanti dalla medicina Ayurvedica e dalla medicina cinese, che sembrano avere degli effetti anti-tumorali<sup>94</sup>. Si pensa che questa tipologia di “medicina alternativa” potrebbe essere utilizzata in combinazione con la medicina tradizionale per aumentarne gli effetti e contrastare il fenomeno della chemio-resistenza<sup>95</sup>. Tra le terapie antineoplastiche più utilizzate, risulta la doxorubicina, che in combinazione con una sostanza naturale, come la berberina, induce un effetto sinergico e una maggiore efficacia del trattamento, mostrando un'attività antitumorale sia *in vitro* che *in vivo*<sup>96</sup>.

### *DOXORUBICINA*

La doxorubicina è un antibiotico ad azione antitumorale appartenente alla classe delle antracicline. Le antracicline impattano pesantemente sui processi cellulari, poiché operano attraverso una moltitudine di meccanismi tra cui, l'inibizione della topoisomerasi II $\alpha$  con conseguente rottura bifilamentosa del DNA, l'azione intercalante sulla sequenza del DNA con conseguente blocco della sintesi di DNA o RNA, la

formazione di radicali con conseguente aumento dello stress ossidativo e il legame alle membrane cellulari con conseguente alterazione della fluidità di membrana e dell'attività dei trasporti ionici<sup>97</sup>. Le antracicline sono risultate agenti cancerogeni, mutageni, teratogeni e genotossici nei ratti e nell'uomo<sup>98</sup>, pur essendo utilizzate nella chemioterapia e ad esse è associata anche la generazione di cardiomiopatie acute e croniche<sup>99,100</sup>. Quindi, ridurre le dosi di doxorubicina combinandola con sostanze naturali e sicure, come la berberina, può non solo favorire l'efficacia del trattamento ma anche ridurre gli effetti collaterali associati all'utilizzo delle antracicline.

### *BERBERINA*

Gli alcaloidi sono utilizzati nella medicina tradizionale per il trattamento di molte malattie. Questi composti sono sintetizzati dalle piante come metaboliti secondari e hanno molteplici effetti sul metabolismo cellulare<sup>101</sup>. Tra i derivati vegetali con proprietà biologiche, l'alcaloide isochinolinico quaternario possiede una vasta gamma di usi terapeutici contro diverse malattie<sup>102</sup>. Negli ultimi anni, la berberina è stata studiata per inibire la proliferazione cellulare e indurre citotossicità nei confronti delle cellule tumorali<sup>103</sup>. Il meccanismo d'azione molecolare della berberina è stato correlato alla sua capacità di legare il DNA ma anche altri bersagli nucleari e citoplasmatici. La berberina interagisce direttamente con gli acidi nucleici e con diverse proteine, tra cui telomerasi, DNA topoisomerasi I, p53, NF-κB, MMP e recettori degli estrogeni; il trattamento con la berberina promuove l'arresto del ciclo cellulare e la morte delle linee cellulari tumorali umane, accoppiato ad una maggiore espressione di fattori apoptotici<sup>104,105</sup>. Le piante hanno ampie proprietà biologiche e medicinali e sono caratterizzate da un'elevata sicurezza, disponibilità, accessibilità e basso costo, rappresentando così una fonte inestimabile di sostanze chimiche con potenziali effetti terapeutici<sup>101</sup>.

## SCOPO DEL PROGETTO

Lo scopo del mio progetto di dottorato è stato quello di isolare le cellule staminali tumorali da linee cellulari immortalizzate di adenocarcinoma del colon retto (CaCo-2 e HT-29) e caratterizzarle sulla base dei livelli di espressione di alcuni dei principali marcatori di staminalità tumorale, CD133, CD44 e LGR5.

Successivamente, le cellule staminali isolate dalle due linee sono state trattate con la doxorubicina, noto antibiotico antraciclinico ad azione antineoplastica, la berberina, alcaloide naturale utilizzato nella medicina cinese ad azione presumibilmente antitumorale sia *in vitro* che *in vivo*<sup>106</sup> e una combinazione delle due in maniera tempo/dose dipendente, con l'obiettivo di misurare gli effetti della combinazione sinergica tra doxorubicina e berberina sulla proliferazione, vitalità e citotossicità delle CST.

Sono stati investigati, inoltre, altri parametri potenzialmente utili nella caratterizzazione delle CST tra cui la localizzazione cellulare del marcatore CD133, l'accumulo di CD133 e di CD44 nelle vescicole extracellulari isolate dalle CST e il ruolo della matrice extracellulare sulle CST.

Questi studi preliminari potrebbero fornire risultati utili nell'evidenziare pathways cellulari coinvolti nella tumorigenesi del cancro del colon, con la prospettiva futura di individuare eventuali nuovi target terapeutici.



## **MATERIALI E METODI**

### **COLTURE LINEE CELLULARI**

Le linee cellulari HT-29 e CaCo-2 sono state acquistate dalla American Type Culture Collection (ATCC). Sono state inizialmente seminate in DMEM con aggiunta di 10% di FBS (fetal bovine serum), 1% di penicillina/streptomicina, 1% di L-Glutammina.

Le colture cellulari sono state quindi incubate per diversi giorni a 37 °C e 5% di CO<sub>2</sub>, per permetterne la loro replicazione e utilizzo in esperimenti successivi.

### **ISOLAMENTO DELLA POPOLAZIONE STAMINALE DA HT-29 E CaCo-2**

Una volta raggiunta la semi-confluenza in terreno standard, le cellule tumorali (CT) in coltura sono state staccate dalle piastre con la tripsina (Trypsin - Fast Cell Dissociation, CORNING), raccolte in due tubi e centrifugate a 1100 rpm per 5'. Il pellet contenuto nel primo tubo è stato ripiastrato in DMEM 10% FBS per mantenere una parte delle CT in coltura, mentre il pellet contenuto nel secondo tubo è stato messo in un terreno di coltura selettivo, DMEM F-12 (Advanced DMEM/F-12, Gibco) privo di siero e addizionato con fattori di crescita specifici, quali EGF (10000X; Peprotech Animal-Free Recombinant Human EGF 100ug), FGF (10000X; Peprotech Recombinant Human FGF-basic 50ug) e N2 (100X; N2 supplement life technologies), che consente di isolare le CST dalle CT; le CT che crescono in adesione vanno, invece, incontro ad apoptosi. Le fiasche utilizzate per la crescita delle CST sono a bassissima adesione (Ultra-Low Attachment 25cm<sup>2</sup> Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap, Corning).

Le CST, in tali condizioni, sono infatti in grado di replicare formando dei cloni che crescono in sospensione sotto forma di aggregati sferici. La formazione delle sfere necessita di un periodo di almeno 15 giorni dalla semina iniziale. Raggiunto un numero cospicuo di cloni di CST, è stato raccolto il surnatante contenente le sfere, centrifugato a 900 rpm per 5', il pellet è stato lavato con PBS 1X per rimuovere eventuali detriti e centrifugato nuovamente a 900 rpm per 5'; successivamente, il pellet è stato disgregato mediante triple (TrypLE™ Select Enzyme, no phenol red, Gibco) e ripiastrato in più fiasche per amplificare la popolazione cellulare staminale.

## **COLTURE PRIMARIE DA BIOPSIE DI METASTASI EPATICHE DI PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA DEL COLON-RETTO**

I campioni di tessuto tumorale ci sono stati forniti dal reparto di Chirurgia generale dell'Ospedale Cardarelli di Campobasso. I tessuti, post-intervento, sono stati mantenuti in PBS 1X con aggiunta di penicillina/streptomicina (100X) e amfotericina B (200X, Amphotericin B 250ug/ml, LIFE TECHNOLOGIES). Il campione è stato sminuzzato meccanicamente con un bisturi sterile e poi enzimaticamente, trasferendo il campione in DMEM con aggiunta di dispasi (1X, Pluristem dispase-II solution, SIGMA-ALDRICH), ialuronidasi (500X), penicillina/streptomicina (100X) e amfotericina B (200X). Il campione è stato lasciato 30' a 37 °C e vortexato di tanto in tanto. È stato recuperato il surnatante e centrifugato a 1100 rpm per 10', il pellet è stato in parte piastrato su pozzetti a bassa adesione cellulare (6-well Clear Flat Bottom Ultra-Low Attachment Microplate, Individually Wrapped, with Lid, Sterile, CORNING) in DMEM F-12 arricchito con i fattori di crescita per isolare le cellule staminali tumorali e l'altra parte in DMEM 10% FBS per favorire l'adesione e il differenziamento cellulare su fiasche normali (25cm<sup>2</sup> Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap, CORNING). I pezzi di tessuto digeriti e il surnatante della prima centrifugata sono stati riuniti e filtrati (70-µm e 40 µm nylon meshes) per recuperare tutto il contenuto cellulare, il mezzo recuperato è stato, poi, centrifugato a 1100 rpm per 10' e piastrate le cellule.

## **TRATTAMENTI CON BERBERINA E DOXORUBICINA SULLE CST**

Le CST in sospensione isolate e amplificate dalle HT-29 e dalle CaCo-2 sono state centrifugate a 900 rpm per 5', lavate in PBS 1X e centrifugate nuovamente, il pellet è stato disgregato con la triple e le cellule diluite in un volume adeguato di DMEM-F12 con aggiunta dei fattori di crescita sono state contate nella cameretta conta cellule con il Trypan Blue per avere un numero adeguato di cellule a seconda delle piastre utilizzate (96 well, 24 well o 6 well microplate). Le CST sono state trattate con la berberina (Berberine chloride, MW 371.81 European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard; purity not less than 98%), la doxorubicina (Doxorubicin hydrochloride, SIGMA-ALDRICH) e una combinazione delle due a concentrazioni e tempi specifici a seconda del tipo di saggio da analizzare: *SAGGIO BRDU*, *SAGGIO MTT*, *SAGGIO DI IMMUNOCITOCHIMICA E WESTERN BLOT*.

## SAGGIO BRDU

Le CST sono state piastrate su piastre multipozzetti da 96 (96-well Plate Feature Standard, CORNING) in un numero pari a ~ 10000 cellule a pozzetto e in un volume di mezzo ~ 200 ul. Dopo 24h di crescita, le cellule sono state trattate a tre tempi 72h, 48h e 24h con la berberina alle concentrazioni di 20 uM (1000X), 40 uM (500 X) e 60 uM (333X), la doxorubicina alle concentrazioni di 250 nM (800 X), 500 nM (400X) e 750 nM (266 X) e una miscela delle due alle concentrazioni di 500 nM e 750 nM di doxorubicina con le concentrazioni 40 uM e 60 uM di berberina. La berberina è stata disciolta in DMSO ad una concentrazione finale di 20 mM; la doxorubicina è stata disciolta in DMSO ad una concentrazione finale di 2 mM e successivamente è stata fatta una diluizione intermedia ad una concentrazione di 200 uM in DMEM F-12. Per le CaCo-2 CST sono state utilizzate concentrazioni di doxorubicina pari a 250 nM (800 X), 125 nM (1600 X) e 83 nM (2400X), poiché a concentrazioni maggiori le cellule risultavano danneggiate; le concentrazioni combinate sono state in questo caso 40 uM e 60 uM di berberina e 125 uM e 250 uM di doxorubicina. Successivamente, è stato seguito il protocollo per il saggio BRDU (5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III, SIGMA-ALDRICH):

- Incubazione con BrdU 10 uM in DMEM-F12 per tutta la notte (soluzione stock BrdU 10 mM in PBS).
- Le CST nelle 96-well sono state centrifugate a 300 g per 10'.
- È stato aspirato lentamente il mezzo, facendo accortezza nel non portarsi dietro le cellule sul fondo del pozzetto.
- Sono state fissate le cellule con 200 uL a pozzetto di soluzione (37% HCl e 70% ETOH) e lasciate per 30' a - 20 °C.
- Lavate le cellule per 3 volte con 250 uL di DMEM.
- Disciolti 100 ul di nucleasi in 9,9 mL di Incubation Buffer (66 mM Tris buffer, 0.66 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 mM 2-mercaptoetanolo) aggiunti 100 ul a pozzetto per 30' a 37 °C.
- Rimossa la nucleasi sono stati effettuati 3 lavaggi con DMEM.
- Aggiunti 100 ul di soluzione Anti-BrdU-POD (anticorpo monoclonale coniugato con la perossidasi) a pozzetto (la soluzione è composta da 100 ul di Anti-BrdU-POD, 1 mL di BSA (10 mg/mL) e 8.9 mL di washing buffer) per 30' a 37 °C.

- Le cellule sono state lavate 3 volte con il washing buffer 1X (PBS).
- Aggiunti 100 ul della soluzione contenente il substrato della perossidasi ABTS (preparato diluendo la polvere di ABTS nel substrato buffer -perborato di sodio e acido citrico-) per qualche minuto; la reazione genera un prodotto idrosolubile di colorazione verde la cui assorbanza viene misurata allo spettrofotometro.
- Lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 405 nm (Victor II, Perkin-Elmer, 253 Milan, Italy). La vitalità cellulare è stata calcolata misurando la differenza in termini di densità ottica tra le CST trattate rispetto alle CST di controllo non trattate.

Il saggio BrdU sfrutta la proprietà di questo composto sintetico poiché è un analogo della timina, per cui viene incorporato nel DNA delle cellule proliferanti, rappresentando un buon indicatore delle cellule che sono in fase mitotica del ciclo cellulare.

## **SAGGIO MTT**

Le CST sono state piastrate su piastre multipozzetti da 96, come per il saggio BrdU. Dopo 24h di crescita cellulare le cellule sono state trattate a tre tempi 72h, 48h e 24h con la berberina alle concentrazioni di 20 uM, 40 uM e 60 uM, la doxorubicina alle concentrazioni di 250 nM, 500 nM e 750 nM e una mix delle due alle concentrazioni di 500 nM e 750 nM di doxorubicina con le concentrazioni 40 uM e 60 uM di berberina. Successivamente, è stato seguito il protocollo per il saggio MTT:

- Sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 200 ul della soluzione di MTT in PBS alla concentrazione finale di 0,5 mg/mL e incubazione delle cellule per 2 ore a 37°C (il tempo d'incubazione non deve superare le 4 ore dato che l'MTT è citotossico).
- Le CST nelle 96-well sono state centrifugate a 300 g per 10'.
- Rimozione dell'MTT e aggiunta in ciascun pozzetto di 100 ul di DMSO per sciogliere i cristalli di formazano formati.
- Lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 570 nm. La vitalità cellulare è stata calcolata misurando la differenza in termini di densità ottica tra le CST trattate rispetto alle CST di controllo non trattate.

Il test MTT è un saggio di citotossicità colorimetrico che permette di testare la proliferazione e la vitalità cellulare e in particolare l'efficienza mitocondriale. L'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) è un sale di tetrazolio che nel

caso di cellule vitali viene ridotto dall'ambiente altamente riducente delle cellule proliferanti per azione dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi. La riduzione dell'MTT determina la formazione di cristalli di formazano che attribuiscono la caratteristica colorazione violacea ai mitocondri delle cellule vitali. Al contrario in cellule non vitali l'MTT non verrà ridotto, con una conseguente colorazione violacea meno intensa.

## **SAGGIO DI IMMUNOCITOCHIMICA**

Nelle multiwell da 24 pozzetti (24-well Clear TC-treated Multiple Well Plates, Individually Wrapped, Sterile, CORNING) sono stati disposti i vetrini coprioggetto e lasciati per 5' sotto gli UV. È stata preparata una soluzione di DMEM e Matrigel 1:30 (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix). Il Matrigel è un preparato di membrana basale in soluzione estratta dal sarcoma di topo di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumore ricco di proteine della matrice extracellulare ed è efficace per l'adesione delle cellule epiteliali normali e trasformate dipendenti dall'ancoraggio e di cellule che crescono in sospensione. Il Matrigel polimerizza rapidamente a temperature dai 22 °C ai 37 °C per produrre una matrice biologicamente attiva che somiglia alla membrana basale delle cellule dei mammiferi; quindi la soluzione è stata preparata utilizzando puntali e piastre a 4 °C. In ciascun pozzetto della 24-well sono stati aggiunti 250 ul della soluzione e incubata la piastra a 37 °C per 2h. Successivamente, è stato aspirato il mezzo e le CT e le CST di entrambe le linee cellulari, dopo averle raccolte e contate (~ 400000 cellule a pozzetto), sono state piastrate sui vetrini. Le CT sono state piastrate in DMEM 10% FBS e le CST in DMEM-F12 con aggiunta dei fattori e lasciate crescere per 24h-48h; una parte delle CST sono state, invece, trattate con la doxorubicina 500 nM, la berberina 60 uM e una combinazione delle due per 24h. Si è proseguito, poi, con il protocollo di immunocitochimica:

- È stato aspirato il mezzo delicatamente.
- Le cellule sono state fissate in paraformaldeide 4% (Sigma-Aldrich, 158127, pH 7.4 e a 4 °C) per 15'.
- Le cellule sono state lavate e reidratate con PBS 1X (3 lavaggi per 3').
- Sono stati fatti due lavaggi da 5' in glicina 0,1M in PBS 1X.
- Lavate nuovamente le cellule in PBS 1X per 3' tre volte.

- Le cellule sono state permeabilizzate con il triton 0,1% (Sigma-Aldrich, T8787) in PBS per 3'.
- Dopo aver lavato nuovamente le cellule con il PBS 1X è stato fatto il blocking con NGS 10% per 20'.
- Incubazione con l'anticorpo primario (Ab 1°) per 45'; la mix di Ab 1° è stata preparata in PBS 1X e NGS 1%; L'Ab 1° è stato utilizzato 1:100. Gli anticorpi utilizzati sono stati CD133 (Life technologies, PA5-38014), CD44 (ABCAM, ab157107), LGR5 (Invitrogen, MA5-25644) e Notch-1 (Notch-1 (A-8); sc-376403 Santa Cruz Biotechnology).
- Le cellule sono state lavate in PBS 1X per 3' tre volte.
- Incubazione con l'anticorpo secondario (Ab 2°) per 35'; la mix di Ab 2° è stata preparata in PBS 1X , NGS 1%, DAPI 1:500, Alexa Fluor 488 nm (1:250, Green anti-Mouse/anti-Rabbit), Alexa Fluor 568 nm (1:250, anti-Rabbit).
- Lavate le cellule per 3' tre volte in PBS 1X.
- I vetrini sono stati, infine, posizionati capovolti sui vetrini portaoggetto con una goccia di Mowiol e dopo essersi asciugati sono stati osservati al microscopio confocale.

## **WESTERN BLOT**

### *Lisati totali*

Le CT sono state piastrate in flasks da 75 cm<sup>2</sup> (75cm<sup>2</sup> U-Shaped Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap, CORNING) in DMEM 10% FBS, mentre le CST sono state piastrate in più piastre 6-well a bassa adesione (6-well Clear Flat Bottom Ultra-Low Attachment Microplate, Individually Wrapped, with Lid, Sterile, CORNING) in DMEM-F12 con i fattori di crescita per avere un numero cospicuo di cellule da lisare. Raggiunta una confluenza cellulare adeguata (~ 80%) si è proceduto con la lisi cellulare. Le CST, prima di essere lisate, sono state in parte trattate con la doxorubicina 500 nM, la berberina 60 uM e una combinazione delle due per 24h e in parte non trattate per avere CST di controllo.

- Le CT, dopo aver rimosso il mezzo, sono state lavate in PBS 1X e recuperate con uno scraper e con aggiunta di un volume adeguato di buffer di lisi (NP40 buffer -NP40 1%, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, Ph 8.0-, Inibitore delle Proteasi 25X

Sodio Ortovanadato ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) 200X e soluzione PMSF 100X); lasciate le cellule in buffer di lisi per 30' in ghiaccio e vortexate di tanto in tanto.

- Le CST sono state centrifugate a 1000 rpm per 5', il pellet è stato lavato in PBS 1X e centrifugate nuovamente a 1000 rpm per 5'; aggiunto un volume adeguato di buffer di lisi a seconda del pellet cellulare; lasciate per 30' in ghiaccio e vortexate di tanto in tanto.
- Sia le CT che le CST sono state, successivamente, centrifugate per 10' a 14000 rpm a 4°C, recuperato il surnatante e conservato a -20 °C.

### *Estratti nucleari/citoplasmatici*

Per studiare la localizzazione di CD133 è stato utilizzato il protocollo di estrazione nucleare/citoplasmatica.

- Le CT e le CST sono state piastrate per avere  $\sim 4 \times 10^7$  cellule.
- Le CT sono state screpate con PBS 1X a 4 °C, raccolte in un tubo e centrifugate per 5' a 1000 rpm a 4 °C; le CST sono state centrifugate a 1000 rpm per 5', il pellet è stato lavato in PBS 1X e centrifugate nuovamente a 1000 rpm per 5' a 4 °C.
- Il pellet delle CT e delle CST è stato risospeso in 300 ul di Cytoplasmatic Extract (CE) buffer 1X (soluzione madre 10 X: HEPES 10 mM, kCl 60 mM, EDTA 1 mM, 0,075% NP-40, DTT 1 mM e Ph 7.6) con aggiunta di PMSF 1 mM e Iibitori di Proteasi 25 X, mantenuto in ghiaccio per 15' e vortexato ogni tanto.
- Le cellule sono state centrifugate a 1500 rpm per 4' a 4 °C.
- (\*) Il surnatante, frazione citoplasmatica, è stato recuperato, trasferito in un'altra eppendorf e mantenuto a 4 °C.
- Il pellet, frazione nucleare, è stato lavato 3 volte con 300 ul di Washing CE buffer 1X (soluzione madre 10 X: HEPES 10 mM, kCl 60 mM, DTT 1 mM) con aggiunta di PMSF 1 mM e Iibitori di Proteasi 25 X e centrifugate le cellule tra un lavaggio e l'altro a 1500 rpm per 4' a 4 °C.
- Sono stati, poi, aggiunti 20 ul di Benzonasi (1 ul di benzonasi + 19 ul di  $\text{H}_2\text{O}$ ) al pellet e incubato per 30' a 4 °C.
- Sono stati aggiunti 100 ul di Nuclear Extract (NE) Buffer 1X (soluzione madre 10X: 20 mM di Tris-HCl, 420 mM NaCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM EDTA e Ph 8)

con aggiunta di PMSF 1 mM e Inibitori di Proteasi 25 X al pellet cellulare con la benzonasi; incubazione per 30' a 4 °C con l'NE Buffer.

- Sono state, infine, centrifugati sia la frazione citoplasmatica, (\*) tenuta da parte, sia la frazione nucleare a 14000 rpm per 10' a 4 °C.
- Il surnatante CE e NE è stato recuperato e conservato a -80 °C.

#### *Estratti vescicolari*

Le CT e le CST sono state piastrate e amplificate, raggiunta una confluenza cellulare di ~ 80%, è stato sostituito alle CT il DMEM 10% FBS con DMEM privo di siero e le cellule sono state incubate per 48h; è stato poi raccolto il mezzo delle CT.

Le CST, invece, sono state in parte trattate con doxorubicina 500 nM, berberina 60 uM e una combinazione delle due per 24h e in parte lasciate come controllo non trattate, sono state centrifugate a 900 rpm per 5' ed è stato recuperato il mezzo, in questo caso già privo di siero. Si è proceduto, poi, con il protocollo di estrazione delle vescicole extracellulari dal mezzo di cultura cellulare:

- Il mezzo recuperato dalle CT e dalle CST è stato centrifugato a 1200 rpm per 10' a 4 °C.
- È stato recuperato il surnatante, cercando di mantenersi lontano dal pellet cellulare per evitare contaminazioni; trasferito il surnatante in un nuovo tubo.
- Centrifugato il surnatante a 4000 rpm per 20' a 4 °C.
- Recuperato il surnatante, trasferito in bottiglie per centrifuga (PPCO tappo a vite in PP, Nalgene, 250 ml, 61,8×127,7 mm) e centrifugato a 12000 rpm per 40' a 4 °C.
- Recuperato il surnatante è stato trasferito in tubi da ultracentrifuga e centrifugato per 1.5h a 38200 rpm a 4 °C.
- È stato recuperato il pellet in PBS 1X e conservato il campione a -20 °C.

#### *Conta della concentrazione proteica*

Preparati e conservati gli estratti totali, nucleari/citoplasmatici e vescicolari, sono stati presi 2 ul di ciascun campione e diluiti ad 800 ul di H<sub>2</sub>O insieme a 200 ul di reagente Bradford. Si è proceduto, poi, con la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. Per risalire alla concentrazione delle proteine ci si è serviti di una retta di



taratura costruita sulla base dei valori di assorbanza ottenuti con quantità note di albumina di siero bovino (BSA).

#### *Preparazione dei campioni*

A seconda delle proteine target da analizzare, sono state utilizzate concentrazioni proteiche diverse da caricare su gel di SDS-poliacrilammide Tris-Tricina (SDS-PAGE). L'estratto proteico da analizzare mediante western blot è stato risospeso in sample buffer (SDS 8%, 24% glicerolo, 100 mM Tris, 100 mM Tricina, 15 mg Ditiotreitolo, 0,05% blue di Comassie). I campioni e il marcatore di peso molecolare (Biorad) sono stati denaturati a 100 °C per 5' prima di essere caricati su gel.

#### *Elettroforesi e trasferimento*

1. La preparazione del gel viene effettuata con una percentuale di acrilammide standard per lo stacking gel (4%) e variabile per il separating gel a seconda del peso molecolare delle proteine da investigare (per la nostra analisi abbiamo utilizzato un gel al 12,5% e al 10%). Il gel è composto da gel buffer 3X (Tris 3 M, SDS 0,3%, pH 8,45), acrilammide 30% (ML037 - HiMedia Leading BioSciences), glicerolo (solo nello strato al 12,5%), acqua bidistillata (q.b. per portare a volume), TEMED (BIO-RAD, #1610801) e ammonio persolfato (AppliChem, 7727-54-0).
2. Una volta polimerizzata l'acrilammide, si caricano i campioni da analizzare ad una concentrazione proteica variabile. L'elettroforesi viene effettuata usando un anodo buffer di corsa 1X (soluzione madre 10X: 0.2 M Tris, pH 8.9) e un catodo buffer 1X (soluzione madre 10X: 0.1 M Tris, 0.1 M Tricina, 0.1% SDS, Ph 8.25) con un apparato Biorad (Mini Protean Tetra Cell). La corsa dei campioni proteici viene svolta a 60-70 V costanti, dopo la quale viene effettuato il trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di PVDF (polivinil difluoruro, Amersham, UK).
3. La membrana viene equilibrata prima con metanolo e poi con transfer buffer 1X (soluzione madre transfer buffer 10X: 144gr glicina –ChemCruz sc-29096-, 30,2gr Tris-base –AppliChem, 2010644-), 20% metanolo e portati a volume con acqua bidistillata, pH 8.3. Il gel viene posto a contatto con la membrana e si dispongono due strati di carta: uno a contatto con il gel, l'altro con la membrana.

In questo modo si ottiene il “sandwich” che sarà inserito nell’apparato di trasferimento (BioRad Trans-Blot Cell).

4. Il trasferimento è stato condotto per tutta la notte in transfer buffer a 25 V. Dopo il trasferimento, la membrana che ha impresse sulla sua superficie le proteine trasferite dal gel, viene incubata con il milk 5% in PBS-Tween 1X (soluzione madre PBS 10X:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100nM, NaCl 1,37 M, KCl 27Nm,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  18 nM) e Tween-20 (0,2%; TC287, HIMEDIA), per 4 ore: questo serve per coprire i siti aspecifici della membrana.
5. Quindi si procede all’incubazione per tutta la notte a 4°C con l’Ab 1° scelto, opportunamente diluito in milk al 5% in PBS-Tween 1X. Gli Ab 1° utilizzati sono stati CD133, CD44, LGR5 e Notch-1; mentre le proteine housekeeping per normalizzare sono state beta-tubulina (T5201, SIGMA-ALDRICH), CD9 (EPR2949, ab92726, ABCAM) e Istone H1 (Histone H1 (AE-4); sc-8030 Santa Cruz Biotechnology).
6. Il giorno seguente sono stati effettuati 3 lavaggi da 10’ in PBS-Tween 1X ed è stata incubata la membrana con l’Ab 2° (anti-rabbit e anti-mouse, SIGMA-ALDRICH) in milk 5% in PBS-Tween 1X per un’ora a temperatura ambiente. Successivamente sono stati effettuati altri 3 lavaggi da 10’ in PBS-Tween 1X, la membrana è stata esposta all’ECL (enhanced chemiluminescence system, GE Health Care) per 5’ e disposta tra due pellicole trasparenti. L’ECL reagisce con le perossidasi emettendo ad una lunghezza d’onda di 428 nm che è in grado di impressionare le lastre da RX (GE Health Care). Le bande delle proteine vengono così identificate sul supporto RX dall’anticorpo specifico utilizzato. In camera oscura si espongono le lastre fotografiche a tempi diversi, a seconda del grado di intensità delle bande. Lo studio densitometrico delle bande analizzate in western blot è stato effettuato con uno strumento gel-doc (Bio-Rad).

#### *Preparazione dei substrati 2D e caratterizzazione meccanica*

1. Sono stati preparati dischi di vetro (World Precision Instruments, FD35-100) da funzionalizzare con acrilammide e bis-acrilammide; disposti su piastre calde (50°C- 70 °C).

2. 250  $\mu$ l di NaOH 20 mM sono stati versati al centro del disco e lasciati asciugare sulla piastra. Dopo l'evaporazione, la soluzione di NaOH ha formato un sottile film semitrasparente sui dischi.
3. 250  $\mu$ l di 3-aminopropiltriectossisilano, reagente attivatore del gel di acrilammide/bis-acrilammide, (APTES, Sigma-Aldrich, 440140) sono stati aggiunti sui dischi con NaOH, sotto cappa, per 10'.
4. I dischi sono stati lavati con H<sub>2</sub>O distillata per 5' tre volte, fino a quando l'APTES non è stato completamente rimosso.
5. I dischi sono stati ricoperti di una soluzione di glutaraldeide (GA) allo 0,5% (Agar Scientific, R1020) in PBS per 30'.
6. Sono stati effettuati numerosi lavaggi per rimuovere la soluzione GA e i dischi sono, poi, stati lasciati asciugare all'aria.
7. I substrati sono stati preparati mescolando acrilammide (Sigma-Aldrich, A4058), metilene-bis-acrilammide (Sigma-Aldrich, M1533), 1/100 volume totale di persolfato di ammonio al 10% (Sigma-Aldrich, A3678) e 1/1000 volume totale N,N,N',N'-tetrametiletildiammine (TEMED, Sigma-Aldrich, T7024). Due diverse combinazioni di acrilammide e bis-acrilammide sono state utilizzate per ottenere idrogel di 1,3 kPa (4 wt/vol% acrilammide e 0,15 wt/vol% bis-acrilammide) e 30 kPa (10 wt/vol% acrilammide e 0,3 wt/vol% bis-acrilammide).
8. 20  $\mu$ l di miscela acrilammide/metilene-bis-acrilammide sono stati versati sui dischi e un vetrino coprioggetti non trattato (15  $\times$  15 mm, Thermo Scientific, BBAD01500150) è stato posto sopra la goccia. Il gel è stato lasciato polimerizzare per 30', quindi il vetrino coprioggetti è stato rimosso e l'idrogel è stato risciacquato due volte per 10'.
9. I gel risultanti avevano uno spessore di 100-120  $\mu$ m misurato al microscopio. Per consentire l'adesione cellulare, i substrati sono stati funzionalizzati con collagene, utilizzando un reticolante fotoattivabile bifunzionale, Nsulphosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate(sulpho-SANP AH, ThermoFisher Scientific, 22589), come agente reticolante per immobilizzare il collagene.
10. La soluzione di sulpho-SANPAH preparata ad una concentrazione di 0,2 mg/ml è stata posta sui substrati di acrilammide ed esposta a 365 nm di luce UV (100 W,

0,8 A; Ted Pella, Inc.) per 10'. Dopo il lavaggio con PBS, gli idrogel sono stati rivestiti con 50 µg/ml di collagene bovino di tipo I (Sigma-Aldrich, C4243) e incubati per 2h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

11. Si è proceduto con la semina delle CT e CST sui substrati di acrilammide funzionalizzati con il collagene. Dopo 24h di crescita le cellule sono state fissate in paraformaldeide 4% e si è proseguito con il protocollo di immunocitochimica.

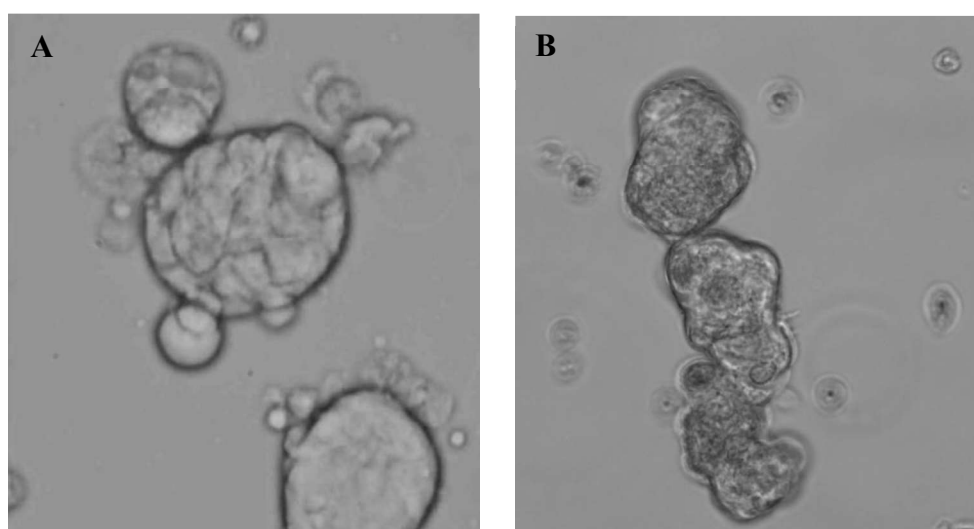
#### *Analisi statistica*

I dati sono riportati come valore medio  $\pm$  errore standard della media (SEM) e la significatività statistica è stata effettuata mediante test t di Student, con un valore di  $p < 0,05$  (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

## RISULTATI

### CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI SULLA BASE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI MARCATORI MOLECOLARI

Le linee tumorali immortalizzate di adenocarcinoma del colon retto, HT-29 e CaCo-2 sono state coltivate in DMEM al 10% di siero per favorire la crescita in adesione delle CT e in assenza di siero e presenza di fattori di crescita specifici per l'isolamento delle CST, le quali si richiamano formando aggregati sferici (colonsfere) se lasciate in coltura per circa 10 giorni (**Figura 11**). La formazione delle colonsfere si associa alla capacità delle CST di auto-rinnovarsi e quindi di crescere in sospensione, formando strutture a forma di sfera. La formazione delle sfere è quindi una caratteristica delle cellule che si auto-rinnovano<sup>107</sup>, tuttavia all'interno della sfera sono presenti anche cellule tumorali non staminali.



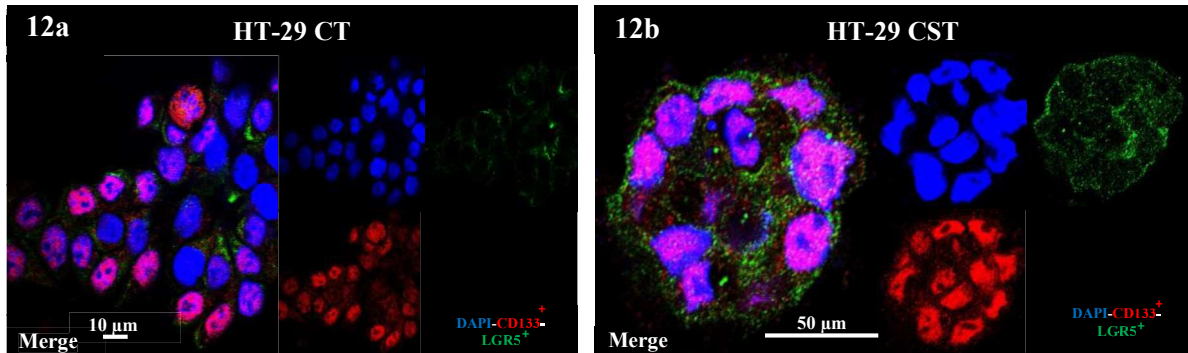
**Figura 11.** Immagini ottenute al microscopio a luce bianca delle colonsfere da HT-29 CT (A) e CaCo-2 CT (B).

Le CST isolate e amplificate sono state, successivamente, caratterizzate sulla base dei livelli di espressione dei marcatori molecolari CD133, CD44 e LGR5, noti in letteratura come i principali marcatori di staminalità tumorale<sup>108</sup>.

I livelli di espressione dei suddetti marcatori tumorali sono stati messi a confronto nelle CT di controllo rispetto alle CST con le analisi di immunocitochimica e di Western Blot.

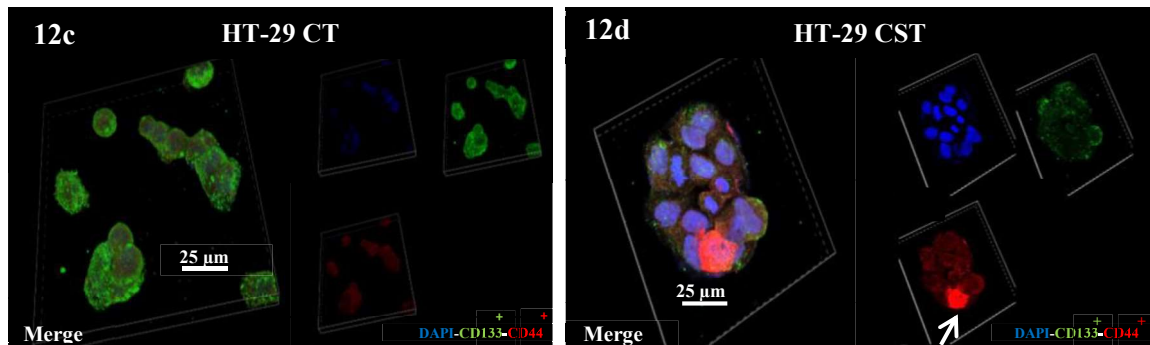
### *Analisi di Immunocitochimica*

In **figura 12a** e **12b** sono riportati i risultati delle analisi di immunocitochimica relativamente alla caratterizzazione sulla base dei marcatori CD133 e LGR5 nelle HT-29 CT rispetto alle HT-29 CST.



Immagini ottenute al microscopio confocale Nikon C2/C2si dei livelli di espressione dei marcatori CD133 (in rosso) LGR5 (in verde) nelle HT-29 CT (**12a**) e nelle HT-29 CST (**12b**). Le immagini sono state poi analizzate con il software NIS-Elements.

In **figura 12c** e **12d** sono riportati i risultati delle analisi di immunocitochimica relativamente alla caratterizzazione sulla base dei marcatori CD133 e CD44 nelle HT-29 CT rispetto alle HT-29 CST.

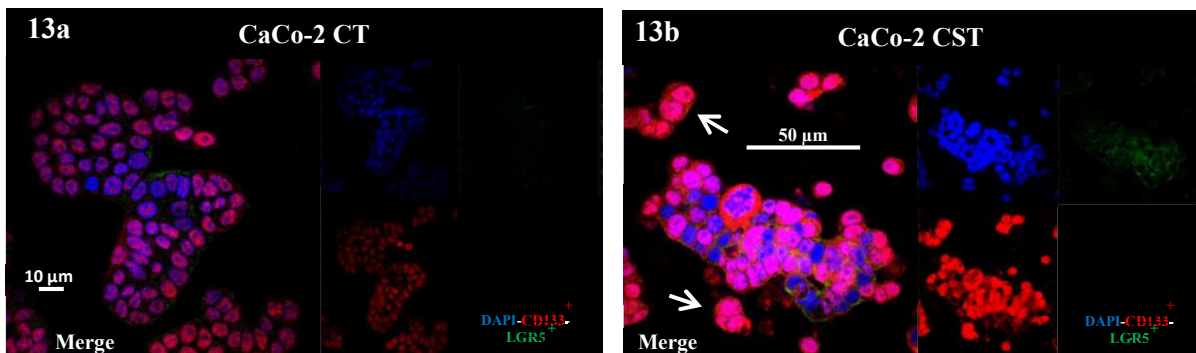


Immagini ottenute al microscopio confocale dei livelli di espressione dei marcatori CD133 (in verde) e CD44 (in rosso) nelle HT-29 CT (**12c**) e nelle HT-29 CST (**12d**).

I risultati mostrano una maggiore espressione dei marcatori CD133, CD44 e LGR5 nelle HT-29 CST rispetto alle CT. Si osserva infatti una maggiore intensità di segnale (in rosso e in verde) nelle CST rispetto che nelle CT, mantenendo le condizioni di analisi costanti. In particolare, CD133 e LGR5 sono espressi in tutte le CST (**figura 12b**), mentre alcune CT mostrano un basso livello di espressione di

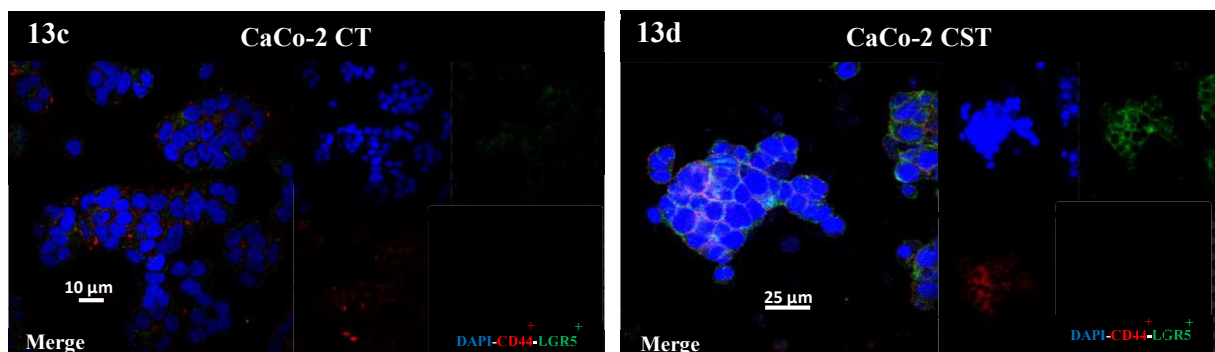
CD133 e di LGR5 (**figura 12a**); CD44 è maggiormente espresso in un pool di cellule all'interno della colonsfera (come indicato dalla freccia in **figura 12d**). Quindi, la popolazione cellulare all'interno della colonsfera è eterogenea ma si arricchisce di CST a confronto con le CT.

In **figura 13a** e **13b** sono riportati i risultati delle analisi di immunocitochimica relativamente alla caratterizzazione sulla base dei marcatori CD133 e LGR5 nelle CaCo-2 CT rispetto alle CaCo-2 CST.



Immagini ottenute al microscopio confocale dei livelli di espressione dei marcatori CD133 (in rosso) e LGR5 (in verde) nelle CaCo-2 CT (**13a**) e nelle CaCo-2 CST (**13b**).

In **figura 13c** e **13d** sono riportati i risultati delle analisi di immunocitochimica relativamente alla caratterizzazione sulla base dei marcatori CD44 e LGR5 nelle CaCo-2 CT rispetto alle CaCo-2 CST.



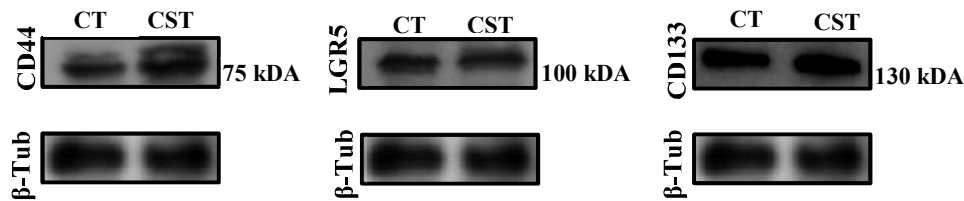
Immagini ottenute al microscopio confocale dei livelli di espressione dei marcatori CD44 (in rosso) e LGR5 (in verde) nelle CaCo-2 CT (**13c**) e nelle CaCo-2 CST (**13d**).

I risultati mostrano una maggiore espressione dei marcatori CD133, CD44 e LGR5 nelle CaCo-2 CST rispetto alle CT. L'intensità di segnale è maggiore nelle CST

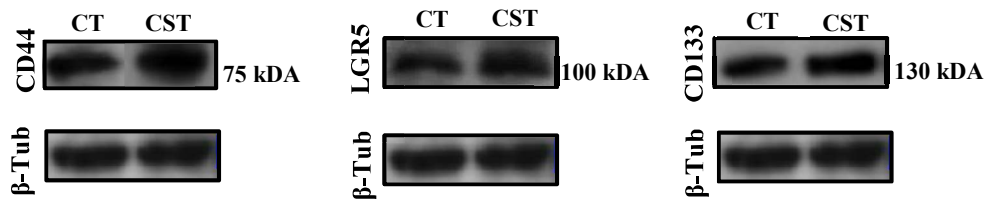
rispetto che nelle CT, alle stesse condizioni di analisi. In particolare, CD133 è presente in tutte le CST ma solo in una quota di queste si osserva nel nucleo (come indicato dalle frecce in **figura 13b**), mentre nelle CT l'espressione di CD133 è completamente nucleare e l'intensità di segnale è minore (**figura 13a**); CD44 e LGR5 sono maggiormente espressi nelle CST (**figura 13d**) rispetto alle CT, che mostrano un basso livello di espressione di CD44 e di LGR5 (**figura 13c**).

#### *Analisi di Western Blot*

In **figura 14a** sono riportati i livelli di espressione dei marcatori di staminalità tumorale CD44, LGR5 e CD133 nelle HT-29 CT rispetto alle HT-29 CST e nelle CaCo-2 CT rispetto alle CaCo-2 CST in **figura 14b**. I risultati mostrano un livello di espressione dei marcatori maggiore nelle CST rispetto alle CT, confermato dall'analisi densitometrica nel **grafico 1** e nel **grafico 2**.

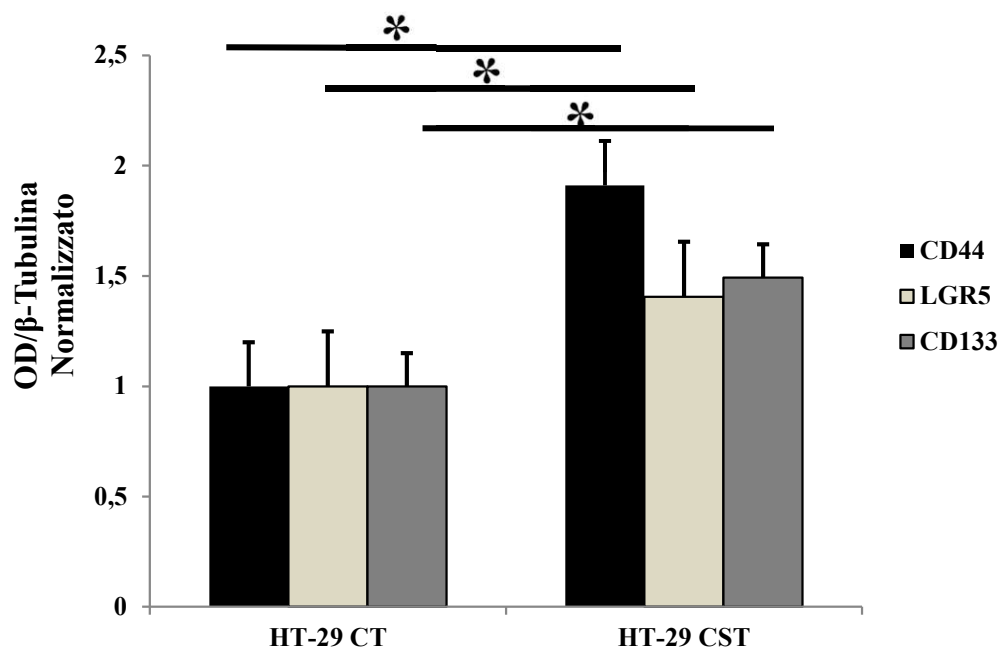


**Figura 14a.** Profilo di espressione dei marcatori CD44, LGR5 e CD133 nelle HT-29 CT vs. le HT-29 CST.

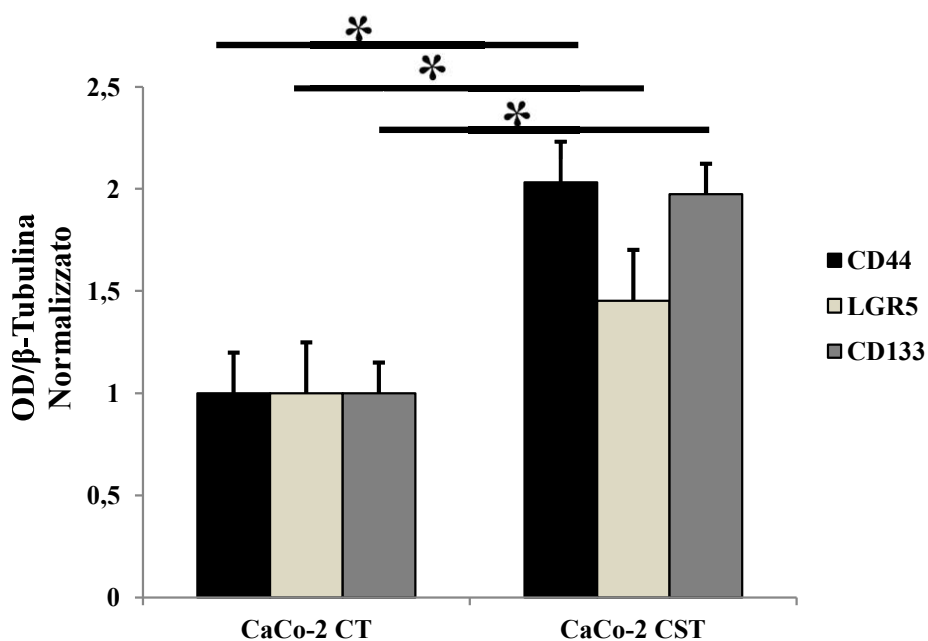


**Figura 14b.** Profilo di espressione dei marcatori CD44, LGR5 e CD133 nelle CaCo-2 CT vs. le CaCo-2 CST.





**Grafico 1.** Analisi densitometrica dei marcatori CD44, LGR5 e CD133 nelle HT-29 CT e nelle HT-29 CST. I dati sono stati normalizzati sulla proteina housekeeping beta-tubulina. Significatività statistica analizzata con il test t di Student (\* $p < 0.05$ ).



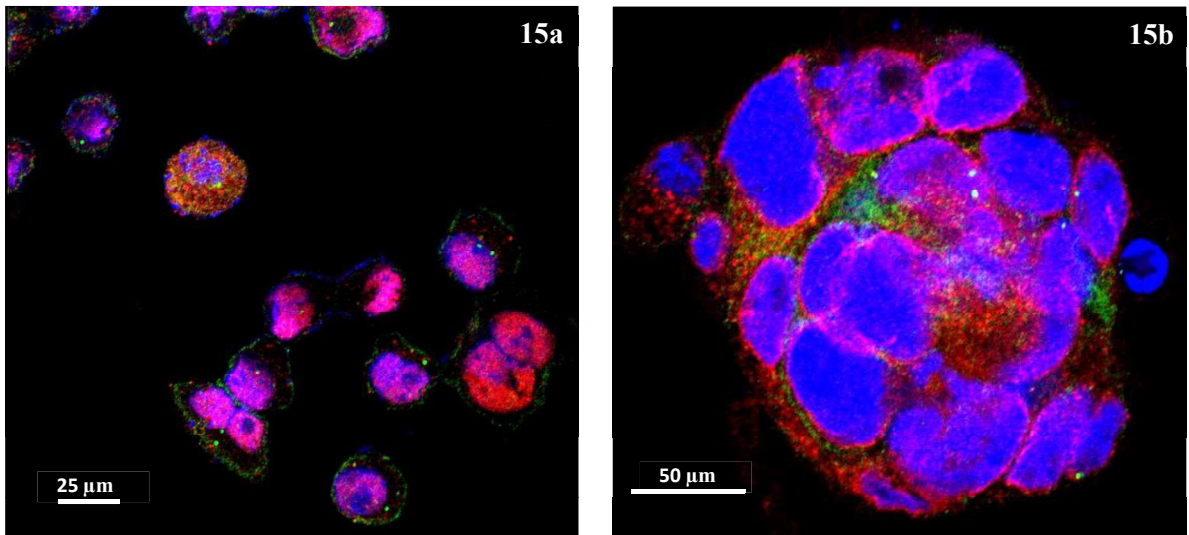
**Grafico 2.** Analisi densitometrica dei marcatori CD44, LGR5 e CD133 nelle CaCo-2 CT e nelle CaCo-2 CST. I dati sono stati normalizzati sulla proteina housekeeping beta-tubulina. Significatività statistica analizzata con il test t di Student (\* $p < 0.05$ ).

## DIFFERENTE LOCALIZZAZIONE DI CD133 TRA LE CaCo-2 CT RISPETTO ALLE CaCo-2 CST

Le CaCo-2 CT hanno mostrato una localizzazione differenziale di CD133 rispetto alle CaCo-2 CST. CD133 è localizzato in maniera predominante nel nucleo delle CaCo-2 CT a differenza delle CaCo-2 CST in cui CD133 è maggiormente espresso sulla superficie cellulare. Per studiare la localizzazione cellulare di CD133 sono state effettuate analisi di immunocitochimica e analisi di Western Blot sugli estratti nucleari e citoplasmatici.

### *Analisi di Immunocitochimica*

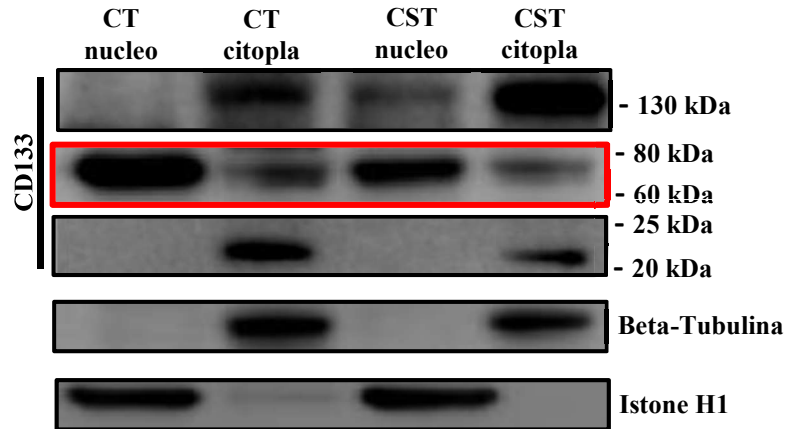
In **figura 15a** e **15b** sono riportati i risultati delle analisi di immunocitochimica relativamente alla localizzazione di CD133 nelle CaCo-2 CT e nelle CaCo-2 CST.



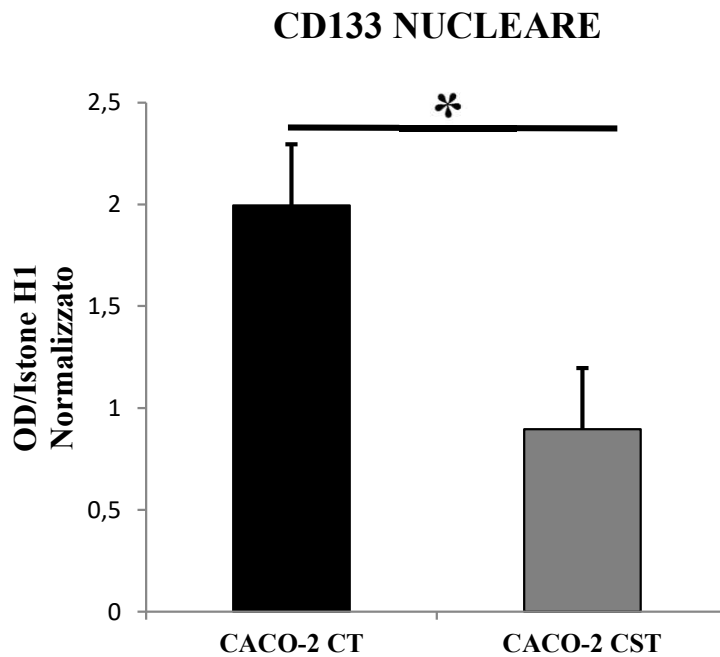
Immagini ottenute al microscopio confocale di CD133 (in rosso) totalmente espresso nel nucleo delle CaCo-2 CT (**figura 15a**) e sulla superficie cellulare nelle CaCo-2 CST (**figura 15b**); Lgr5 (in verde).

### *Analisi di Western Blot*

I risultati del Western Blot mostrano che CD133 si localizza maggiormente nel nucleo delle CaCo-2 CT rispetto che nel nucleo delle CaCo-2 CST. Gli estratti nucleari e citoplasmatici sono stati ottenuti seguendo il protocollo di estrazione nucleo/citoplasma (vedi metodi). La forma intera di CD133 corrisponde alla banda di 130 kDa, tra 80-60 kDa si osserva il frammento nucleare di CD133 e un'ulteriore banda tra 25-20 kDa è presente nella frazione citoplasmatica sia delle CaCo-2 CT sia delle CaCo-2 CST. I frammenti di CD133 osservati non sono noti in letteratura (**figura 16**).



**Figura 16.** Nelle CaCo-2 CT e CST si osserva una banda di 130 kDa corrispondente alla forma intera di CD133. Il frammento di CD133 compreso tra 80 kDa e 60 kDa aumenta nel nucleo delle CaCo-2 CT rispetto che delle CaCo-2 CST. Un'ultima banda, nella frazione citoplasmatica delle CaCo-2 CT e CST, si osserva intorno a 25-20 kDa. Proteina housekeeping beta-tubulina utilizzata per la frazione citoplasmatica e istone H1 per la frazione nucleare.



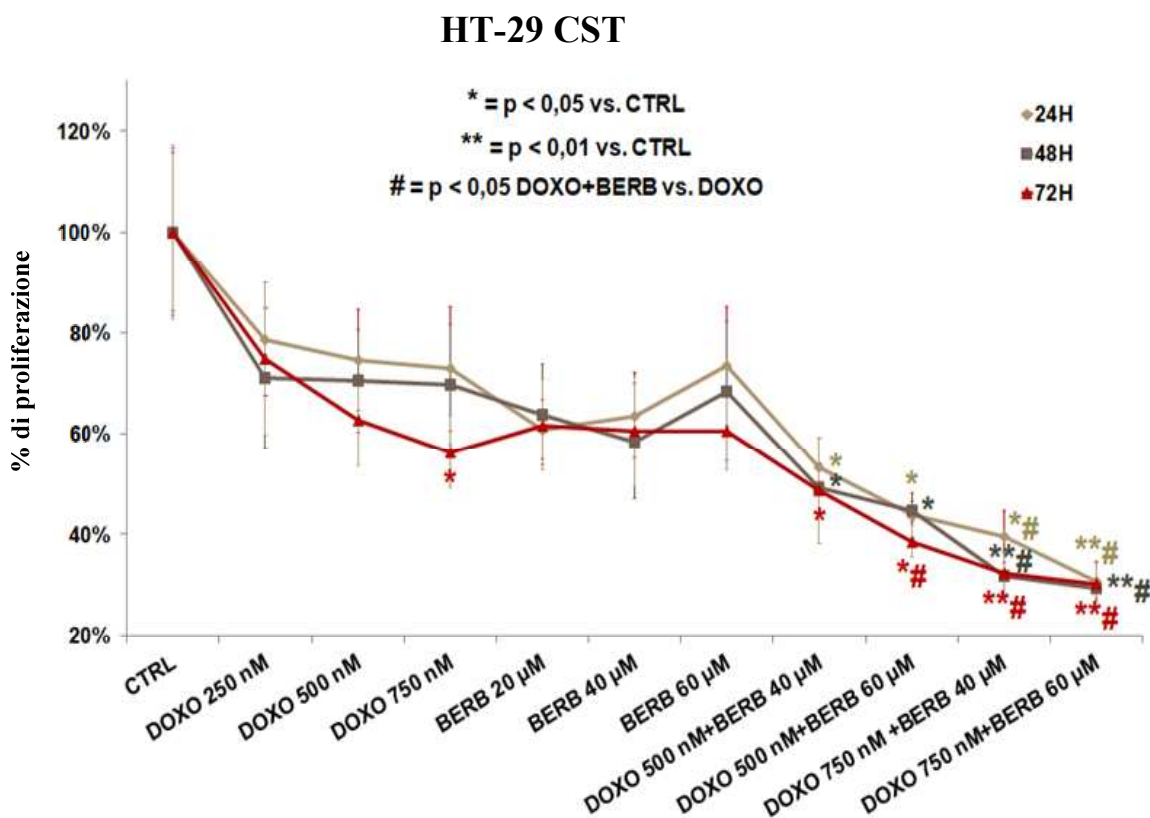
**Grafico 3.** Analisi densitometrica del marcatore CD133 nella frazione nucleare delle CaCo-2 CT e delle CaCo-2 CST. I dati sono stati normalizzati sulla proteina nucleare housekeeping istone H1. Significatività statistica analizzata con il test t di Student (\*p < 0.05).

## TRATTAMENTO DELLE HT-29 CST E DELLE CaCo-2 CST CON DOXORUBICINA, BERBERINA E L'AZIONE COMBINATA DEI DUE

Le CST isolate dalle due linee cellulari sono state trattate con dosi crescenti di doxorubicina, berberina e una miscela dei due per 24h, 48h e 72h. La percentuale di CST proliferanti e vitali è stata valutata attraverso i saggi BRDU e MTT.

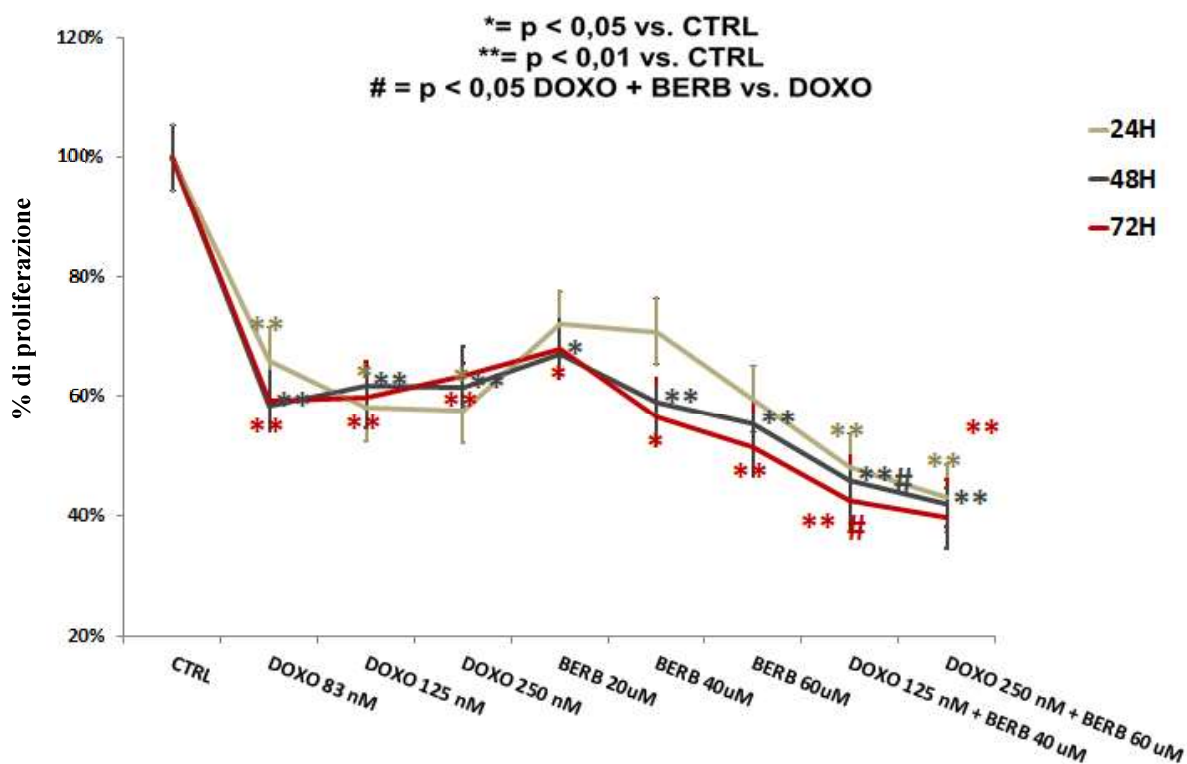
Nel **grafico 4** e nel **grafico 5** sono riportati i risultati del saggio BRDU sulle HT-29 CST e sulle CaCo-2 CST. Le dosi di doxorubicina utilizzate non sono le stesse tra le due linee cellulari poiché le concentrazioni di doxorubicina utilizzate sulle HT-29 CST mostravano un effetto nocivo sulle CaCo-2 CST per questo tipo di saggio.

*Saggio BRDU*



**Grafico 4.** % di proliferazione delle HT-29 CST trattate con doxorubicina (DOXO), berberina (BERB) e una combinazione dei due in maniera tempo/dose dipendente. Significatività statistica analizzata con il test t di Student (\*p < 0.05 rispetto al controllo "CTRL"; \*\*p < 0,01 rispetto al CTRL; #p < 0,05 trattamento combinato rispetto alla singola dose di doxorubicina 750 nM).

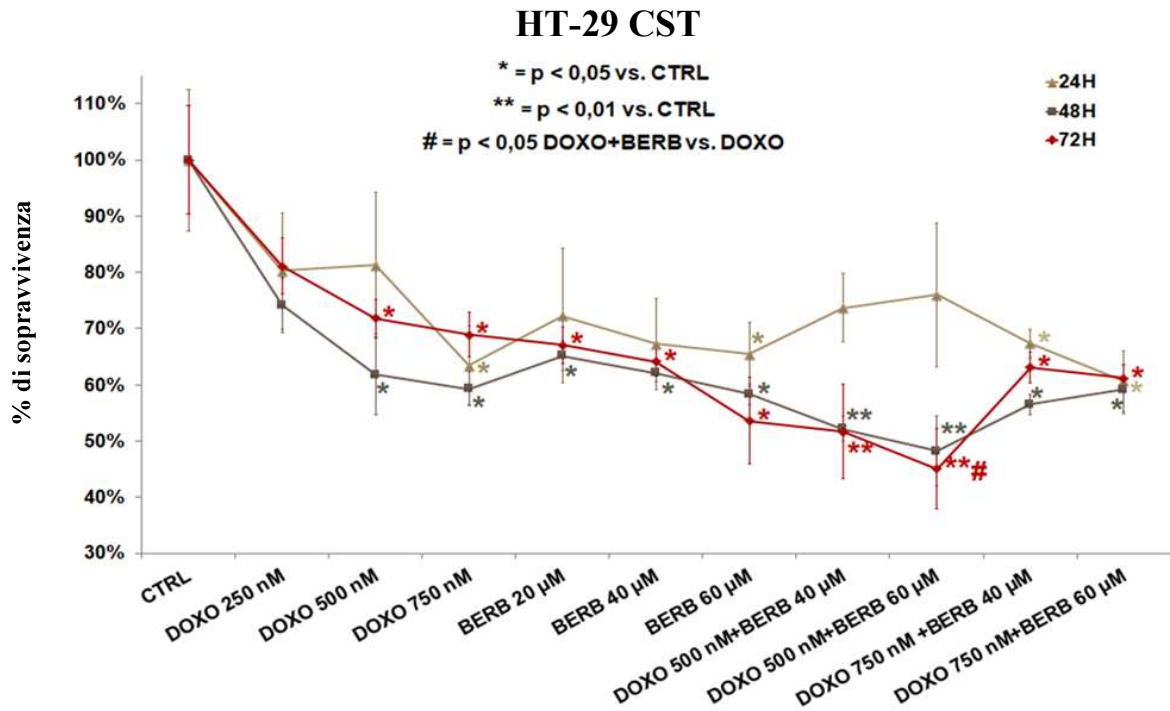
## CaCo-2 CST



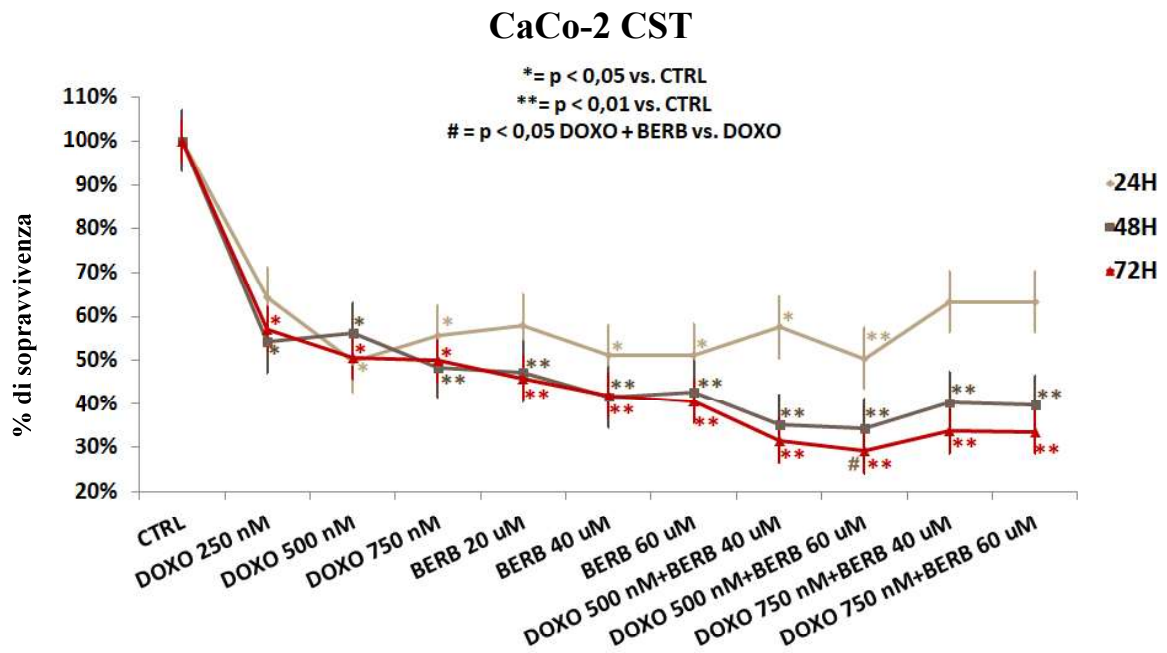
**Grafico 5.** % di proliferazione delle CaCo-2 CST trattate con doxorubicina, berberina e una combinazione dei due in maniera tempo/dose dipendente. Significatività statistica analizzata con il test t di Student (\* $p < 0.05$  rispetto al CTRL; \*\* $p < 0,01$  rispetto al CTRL; # $p < 0,05$  trattamento combinato rispetto alla singola dose di doxorubicina 250 nM).

Nel **grafico 6** e nel **grafico 7** sono riportati i risultati del saggio MTT sulle HT-29 CST e sulle CaCo-2 CST. In questo caso le dosi di doxorubicina utilizzate sono le stesse per ambedue le linee cellulari, in quanto non sono stati riscontrati effetti dannosi sulle CaCo-2 CST a parità di concentrazioni utilizzate.

Saggio MTT



**Grafico 6.** % di sopravvivenza delle HT-29 CST trattate con doxorubicina, berberina e una combinazione dei due in maniera tempo/dose dipendente. Significatività statistica analizzata con il test t di Student (\*p < 0.05 rispetto al CTRL; \*\*p < 0,01 rispetto al CTRL; #p < 0,05 trattamento combinato rispetto alla singola dose di doxorubicina 750 nM).

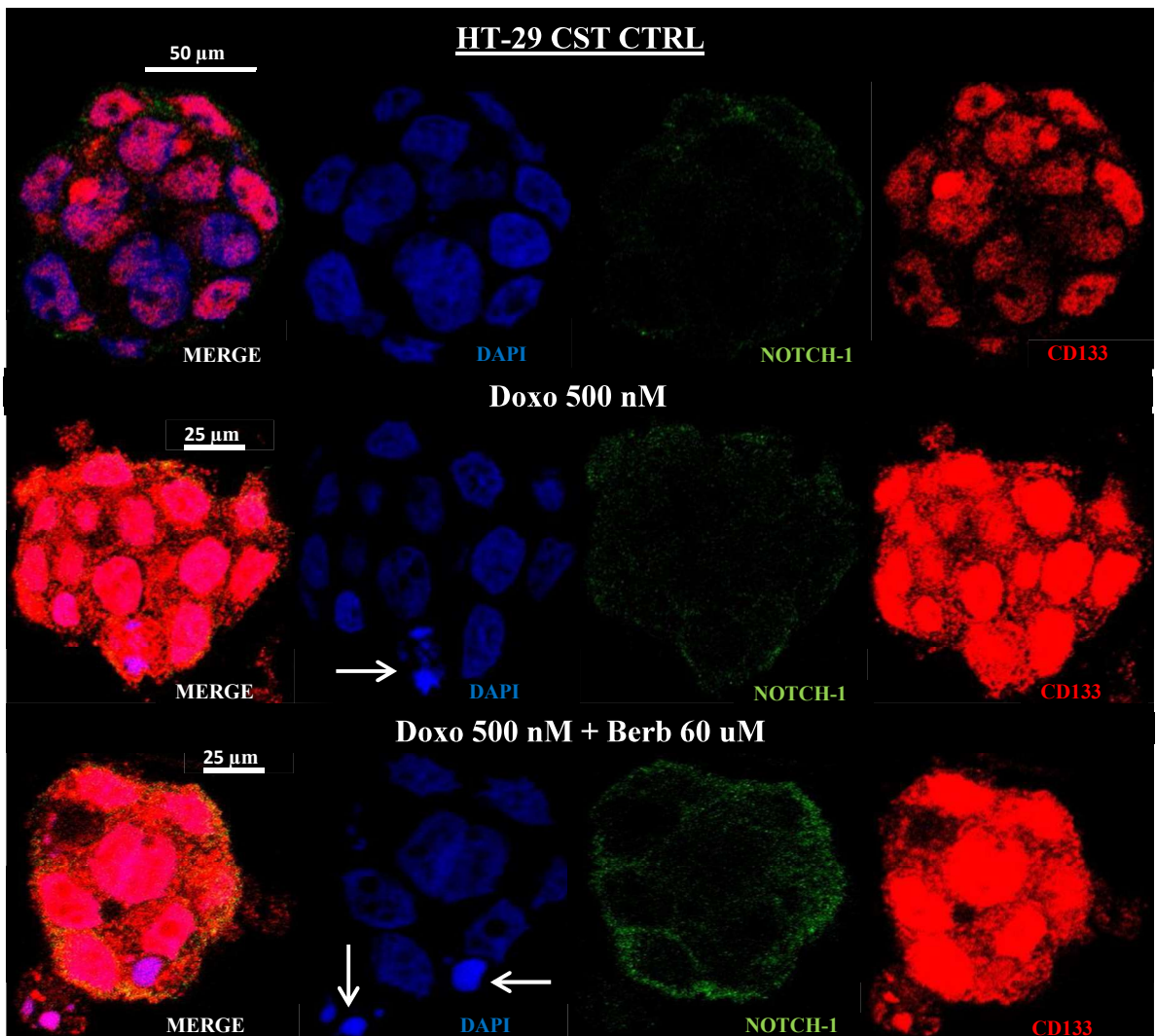


**Grafico 7.** % di sopravvivenza delle CaCo-2 CST trattate con doxorubicina, berberina e una combinazione dei due in maniera tempo/dose dipendente. Significatività statistica analizzata

con il test t di Student (\*p < 0,05 rispetto al CTRL; \*\*p < 0,01 rispetto al CTRL; #p < 0,05 trattamento combinato rispetto alla singola dose di doxorubicina 750 nM).

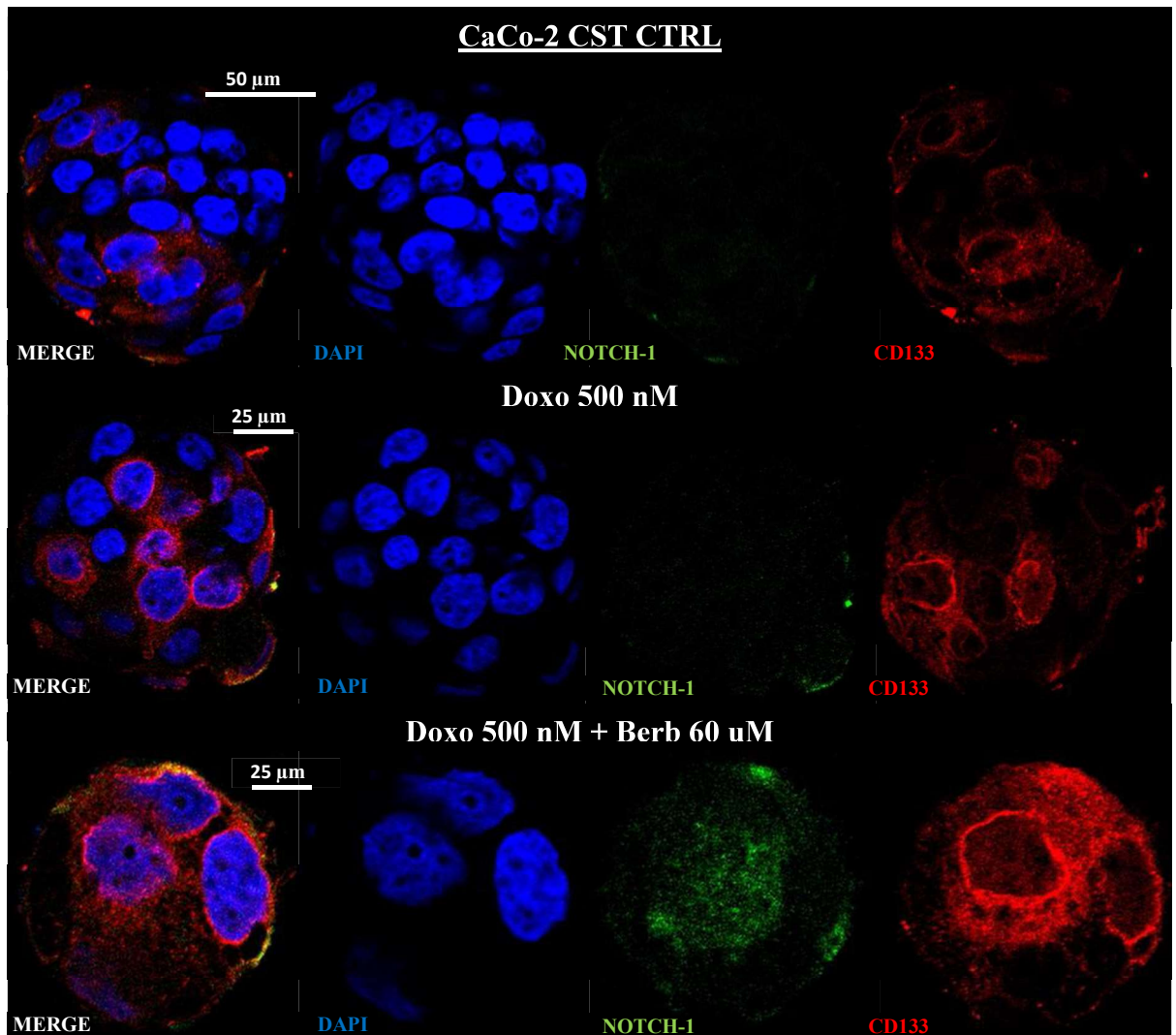
#### *Analisi di Immunocitochimica*

In **figura 17a** e **17b** sono riportati i risultati delle analisi di immunocitochimica relativamente all'espressione di CD133 e di Notch-1 nelle HT-29 CST e nelle CaCo-2 CST dopo 24h di trattamento singolo con doxorubicina 500 nM e trattamento combinato con doxorubicina 500 nM + berberina 60 uM rispetto alle CST di controllo.



**Figura 17a.** Immagini ottenute al microscopio confocale dei livelli di espressione di CD133 (in rosso) e di NOTCH-1 (in verde) nelle HT-29 CST trattate per 24h con doxorubicina 500 nM e doxorubicina 500 nM + berberina 60 uM rispetto alle HT-29 CST CTRL. I nuclei cellulari (in blu), indicati con la freccia, risultano danneggiati nelle HT-29 CST trattate, nonché il numero di cellule

all'interno delle colonsfere trattate risulta sensibilmente ridotto rispetto al CTRL. Immagini rappresentative dello Z-stack acquisito.



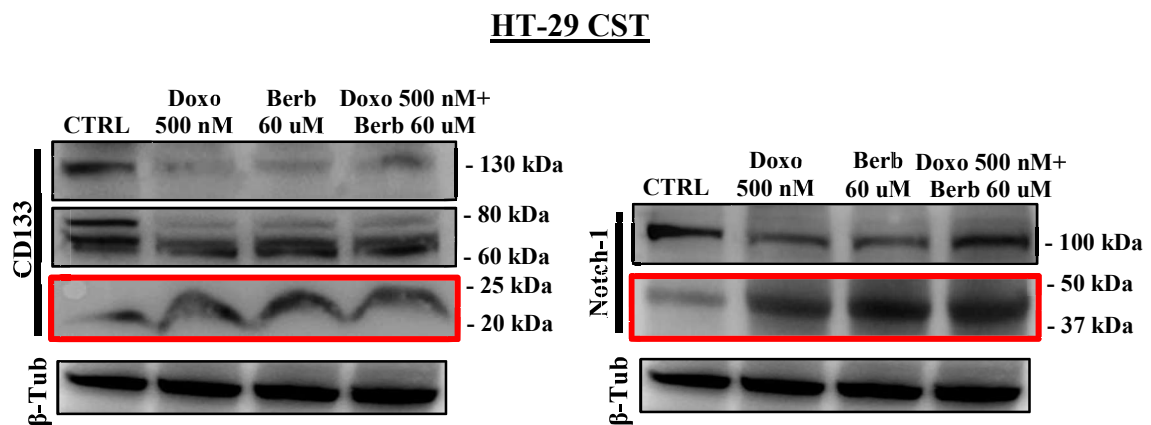
**Figura 17b.** Immagini ottenute al microscopio confocale dei livelli di espressione di CD133 (in rosso) e di NOTCH-1 (in verde) nelle CaCo-2 CST trattate per 24h con doxorubicina 500 nM e doxorubicina 500 nM + berberina 60 uM rispetto alle CaCo-2 CST CTRL. Il numero di cellule all'interno delle colonsfere trattate risulta sensibilmente ridotto rispetto al CTRL. Immagini rappresentative dello Z-stack acquisito.



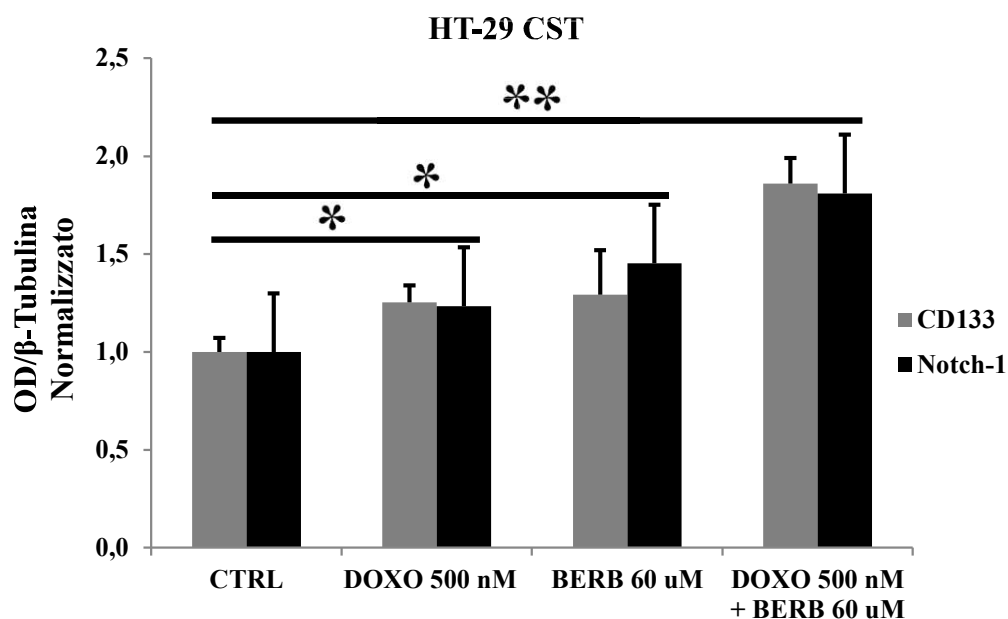
### *Analisi di Western Blot*

I risultati del Western Blot sui lisati proteici totali hanno mostrato un differente livello di espressione di CD133 e di Notch-1 nelle HT-29 CST trattate rispetto alle CST di controllo (**figura 18**). I risultati mostrano una banda di CD133 di circa 130 kDa, forma intera della proteina, una banda compresa tra 80-60 kDa, corrispondente al frammento nucleare, e un'ultima banda tra 25-20 kDa, non nota in letteratura. L'accumulo del frammento di CD133 compreso tra 25 kDa e 20 kDa si osserva in particolare nelle HT-29 CST dopo trattamento combinato rispetto alle CST di controllo.

Riguardo Notch-1, invece, si osserva una banda di circa 100 kDa (probabilmente corrispondente al dominio IC; la forma intera del recettore è ~ 300 kDa) e l'accumulo di un frammento tra 37-50 kDa nelle HT-29 CST trattate rispetto alle CST di controllo, in particolare nel trattamento combinato.



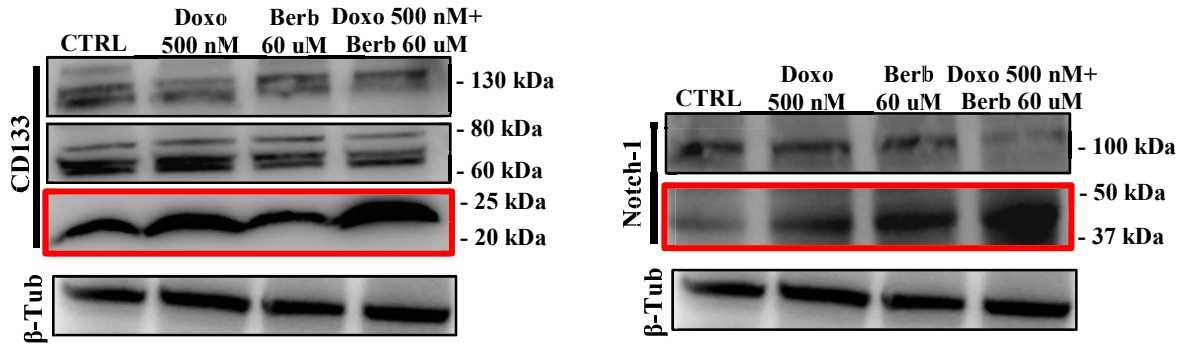
**Figura 18.** Gli estratti totali delle HT-29 CST trattate mostrano un pattern di espressione di CD133 e di Notch-1 differente rispetto alle HT-29 CST CTRL. Le bande di CD133 osservate sono: il precursore intero di CD133 (130 kDa), il frammento di 80-60 kDa e l'accumulo di un frammento compreso tra 25 kDa e 20 kDa, in particolare nelle CST dopo trattamento combinato rispetto al CTRL. Le bande di Notch-1 osservate sono: Notch-1 di circa 100 kDa e l'accumulo di un frammento compreso tra 50 kDa e 37 kDa trattamento dipendente.



**Grafico 8.** Analisi densitometrica dei frammenti di CD133 (tra 25 kDa e 20 kDa) e Notch-1 (tra 50 kDa e 37 kDa) sui lisati totali delle HT-29 CST CTRL, trattate con doxorubicina 500 nM, berberina 60 uM e dopo trattamento combinato. Significatività statistica analizzata con il test t di Student (\*p < 0.05 rispetto al CTRL; \*\*p < 0.01 rispetto al CTRL).

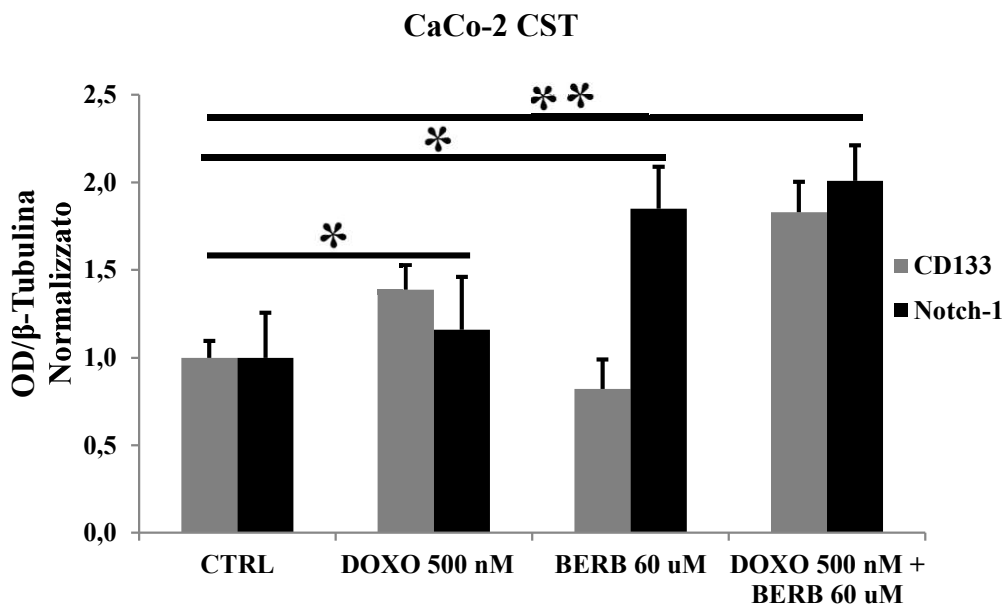
Allo stesso modo, i risultati dell'analisi di Western Blot mostrano un differente livello di espressione di CD133 e di Notch-1 nelle CaCo-2 CST trattate rispetto alle CST di controllo (**figura 19**). Nelle CaCo-2 CST trattate rispetto al controllo si osserva un accumulo del frammento di CD133 compreso tra 25 kDa e 20 kDa, in particolare nelle CaCo-2 CST dopo trattamento combinato. Si osserva, inoltre, l'aumento di un frammento di NOTCH-1 compreso tra 50 kDa e 37 kDa e l'aumento risulta netto tra le CaCo-2 CST dopo trattamento combinato rispetto alle CST di controllo.

## CaCo-2 CST



**Figura 19.** Gli estratti totali delle CaCo-2 CST trattate mostrano un pattern di espressione di CD133 e di Notch-1 differente rispetto alle CaCo-2 CST CTRL. Le bande di CD133 osservate sono: il precursore intero di CD133 (130 kDa), il frammento di 80-60 kDa e l'accumulo di un frammento compreso tra 25 kDa e 20 kDa, in particolare nelle CST dopo trattamento combinato rispetto al CTRL.

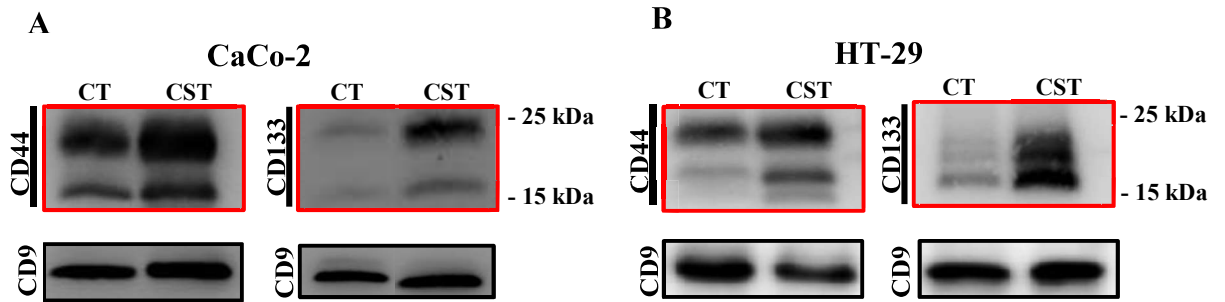
Le bande di Notch-1 osservate sono: Notch-1 di circa 100 kDa e l'accumulo di un frammento compreso tra 50 kDa e 37 kDa trattamento dipendente.



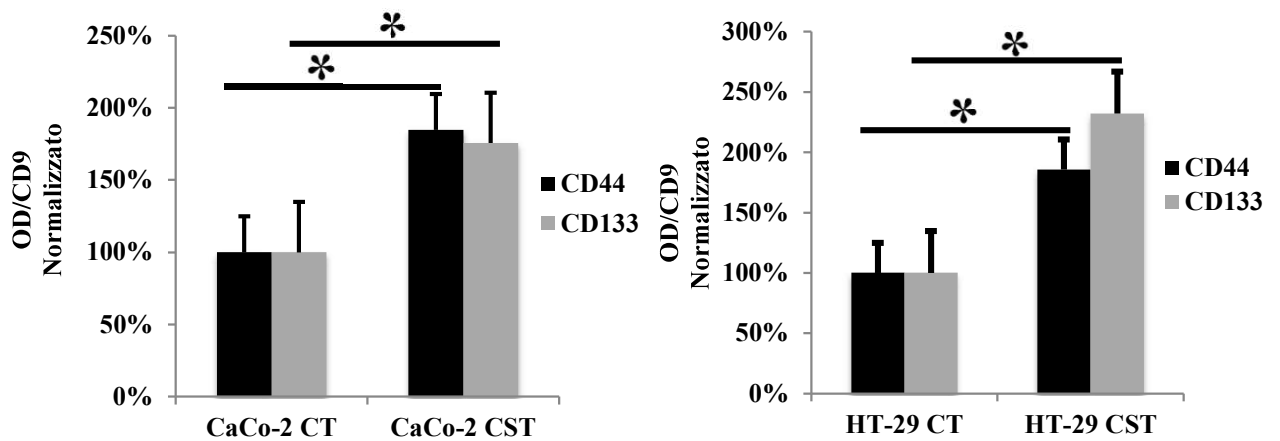
**Grafico 9.** Analisi densitometrica dei frammenti di CD133 tra (25 kDa e 20 kDa) e Notch-1 (tra 50 kDa e 37 kDa) sui lisati totali delle CaCo-2 CST CTRL, trattate con doxorubicina 500 nM, berberina 60 uM e dopo trattamento combinato. Significatività statistica analizzata con il test t di Student (\*p < 0.05 rispetto al CTRL; \*\*p < 0.01 rispetto al CTRL).

## ACCUMULO DEI FRAMMENTI DI CD44 E CD133 NELLE VESICICOLE EXTRACELLULARI ISOLATE DALLE HT-29 E CaCo-2

Le vescicole extracellulari sono state isolate seguendo il protocollo di estrazione vescicolare (vedi metodi). I risultati ottenuti dalle analisi di Western Blot mostrano un accumulo dei frammenti (tra 25 kDa e 15 kDa) di CD133 e CD44 maggiore nelle CST rispetto alle CT sia nelle CaCo-2 (**figura 20A**) che nelle HT-29 (**figura 20B**).



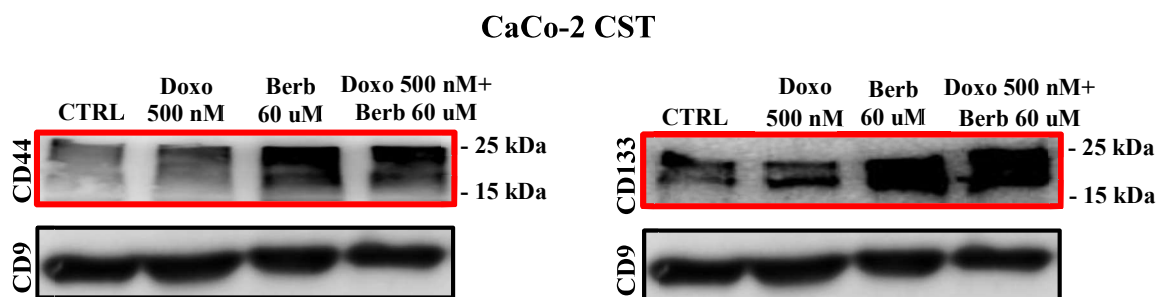
**Figura 20.** Le vescicole extracellulari isolate dalle CaCo-2 CT e CST (A) mostrano un accumulo di frammenti (tra 25 kDa e 15 kDa) di CD44 e CD133 nelle CST rispetto alle CT. Allo stesso modo, nelle vescicole extracellulari delle HT-29 CST si osserva un aumento dei frammenti (tra 25 kDa e 15 kDa) di CD44 e CD133 rispetto alle HT-29 CT (B).



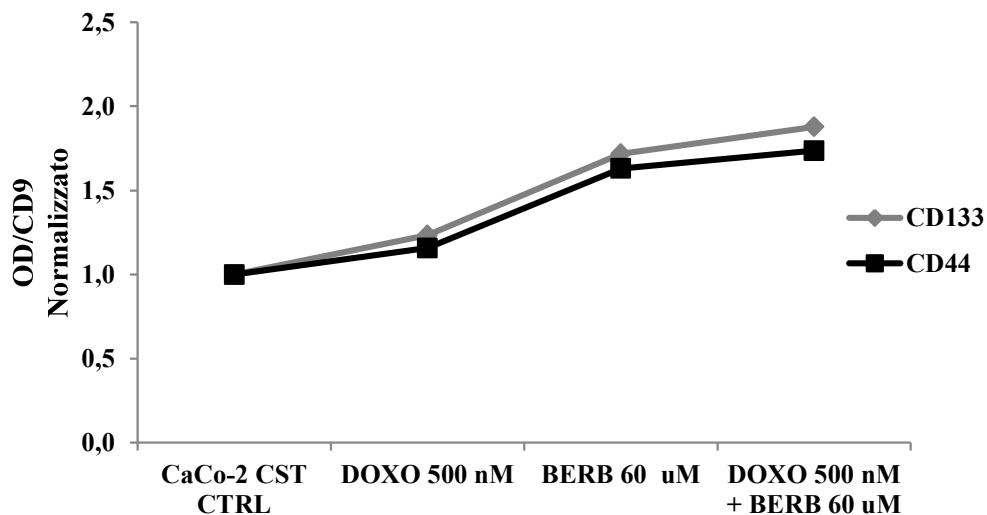
**Grafico 10.** Analisi densitometrica dei frammenti di CD44 e CD133 sugli estratti vescicolari delle HT-29 e CaCo-2 CT e CST. I dati sono stati normalizzati sulla proteina marcatore vescicolare CD9. Significatività statistica analizzata con il test t di Student (\* $p < 0.05$  rispetto al CTRL).

*Aumento dei frammenti di CD44 e CD133 nelle vescicole extracellulari in maniera trattamento-dipendente*

I risultati dell'analisi di Western Blot sugli estratti vescicolari delle CaCo-2 CST dopo trattamento con doxorubicina 500 nM, berberina 60 uM e una combinazione delle due hanno mostrato un accumulo di frammenti di CD133 e CD44 tra 25 e 15 kDa in particolare dopo trattamento combinato rispetto al controllo non trattato (**figura 21**). I risultati ottenuti sulle HT-29 CST sono invece poco chiari e non mostrano lo stesso andamento osservato sulle CaCo-2 CST. Si tratta, comunque, di dati preliminari che necessitano di ulteriori approfondimenti.



**Figura 21.** Le vescicole extracellulari isolate dalle CaCo-2 CST dopo trattamento con Doxo 500 nM, Berb 60 uM e Doxo 500 nM + Berb 60 uM mostrano un accumulo di frammenti (tra 25 kDa e 15 kDa) di CD44 e CD133 maggiore rispetto alle CTRL.



**Grafico 11.** Analisi densitometrica dei frammenti di CD44 e CD133 sugli estratti vescicolari dalle CaCo-2 CST CTRL e trattate. I dati sono stati normalizzati sulla proteina marcatore vescicolare CD9. Dati preliminari non statisticamente significativi.

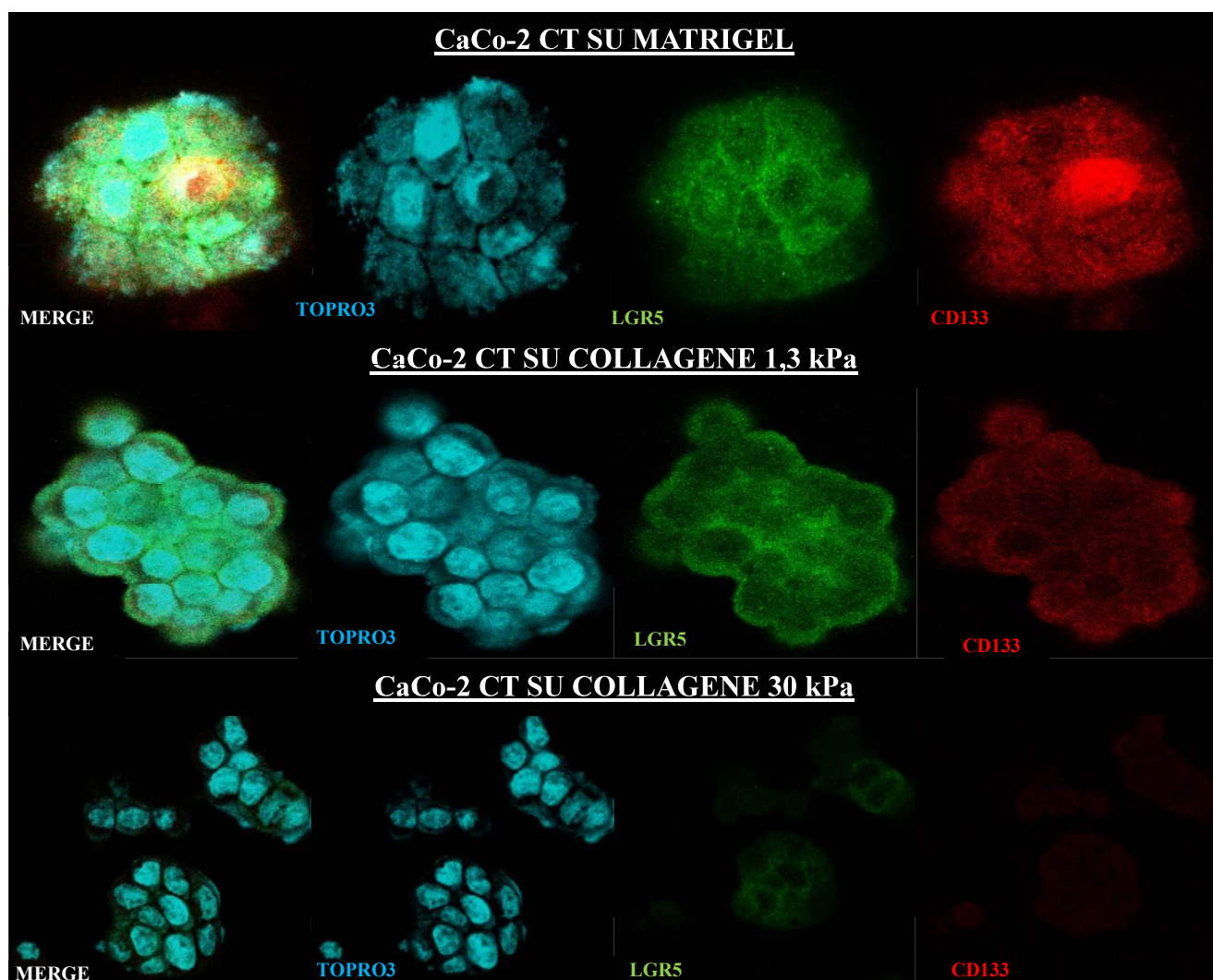
## **RUOLO DELLA MATRICE EXTRACELLULARE SUL COMPORTAMENTO DELLE CST *IN VITRO***

Allo scopo di ottenere un controllo nel meccanismo di progressione tumorale, è estremamente necessario costruire *ex novo* un analogo della matrice extracellulare in grado di imitare il microambiente *in vivo* in termini di composizione chimica e proprietà meccaniche in condizioni sia fisiologiche che patologiche.

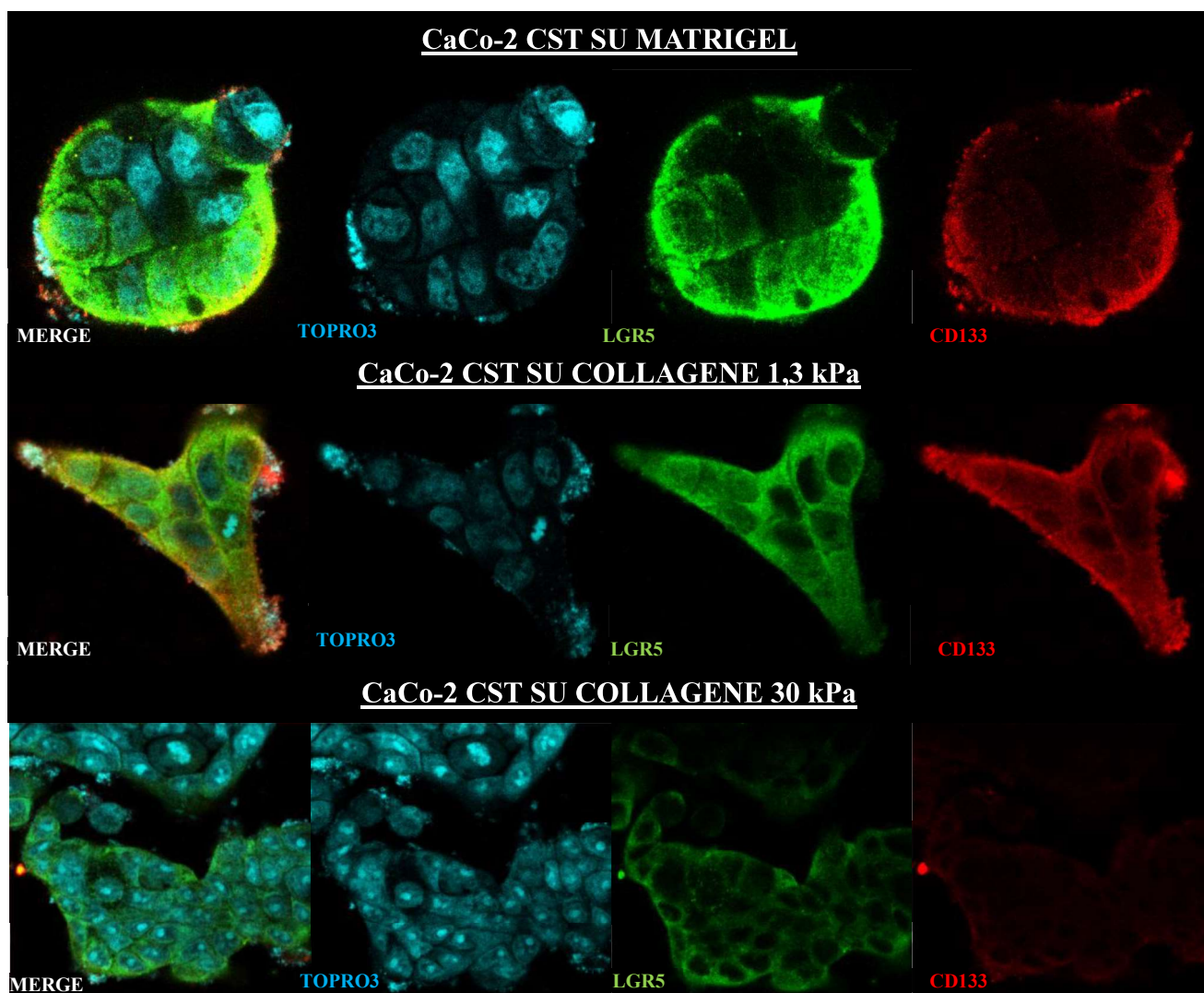
Quindi, in concomitanza agli studi condotti sulle linee tumorali immortalizzate, è stato studiato anche il ruolo della ECM. Le analisi di immunocitochimica sono state inizialmente condotte su CT e CST piastrate su MATRIGEL, per favorire l'adesione delle CST sui vetrini. Successivamente, ipotizzando che il substrato di crescita cellulare potesse influenzare alcuni meccanismi molecolari si è pensato di confrontare le CST piastrate su MATRIGEL con altre matrici. Infatti, nel periodo di svolgimento delle attività presso i laboratori del DICMaPI dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", è stata possibile la realizzazione di substrati 2D naturali, opportunamente ingegnerizzati per emulare le caratteristiche meccaniche della ECM sana e tumorale. Sono stati investigati parametri molecolari, come l'adesione cellula/ECM e cellula/cellula e l'espressione dei marcatori di staminalità CD133 e LGR5.

In **figura 22a** e **figura 22b** sono riportati i risultati delle analisi di immunocitochimica relativamente all'espressione di CD133 e LGR5 nelle CaCo-2 CT e nelle CaCo-2 CST dopo tre giorni di crescita. Le cellule sono state piastrate su MATRIGEL, secondo il nostro protocollo, e messe a confronto con le cellule piastrate su substrati con una rigidità di 1,3 kPa (SOFT) e 30 kPa (HARD) funzionalizzati con il collagene. Le rigidità del substrato sono state determinate dalla % di acrilammide e bis-acrilammide utilizzate (vedi metodi).

I risultati mostrano una riduzione dell'intensità di segnale dei marcatori LGR5 e CD133 nelle CaCo-2 CT e CST su collagene SOFT e HARD rispetto al MATRIGEL. Inoltre, l'adesione delle CaCo-2 CST sul substrato HARD è notevolmente maggiore rispetto che sul MATRIGEL. Si tratta ancora di dati preliminari che dovranno essere confermati con ulteriori analisi, ma che comunque mostrano l'influenza della ECM sull'attività cellulare.



**Figura 22a.** Immagini ottenute al microscopio confocale dei livelli di espressione di LGR5 (in verde) e di CD133 (in rosso) nelle CaCo-2 CT piastrate e lasciate crescere per tre giorni su matrigel, collagene SOFT e collagene HARD. L'intensità di segnale dei marcatori LGR5 e CD133 si riduce nelle CaCo-2 CT su collagene SOFT e HARD vs. MATRIGEL. La localizzazione nucleare di CD133 è più evidente nelle CT su MATRIGEL vs. collagene SOFT e HARD. Immagini rappresentative dello Z-stack acquisito.



**Figura 22b.** Immagini ottenute al microscopio confocale dei livelli di espressione di LGR5 (in verde) e di CD133 (in rosso) nelle CaCo-2 CST piastrate e lasciate crescere per tre giorni su matrigel, collagene SOFT e collagene HARD. L'intensità di segnale dei marcatori LGR5 e CD133 si riduce nelle CaCo-2 CST su collagene SOFT e HARD vs. MATRIGEL e la differenza di adesione cellula/ECM sui diversi substrati comporta di conseguenza una diversa morfologia cellulare. Immagini rappresentative dello Z-stack acquisito.

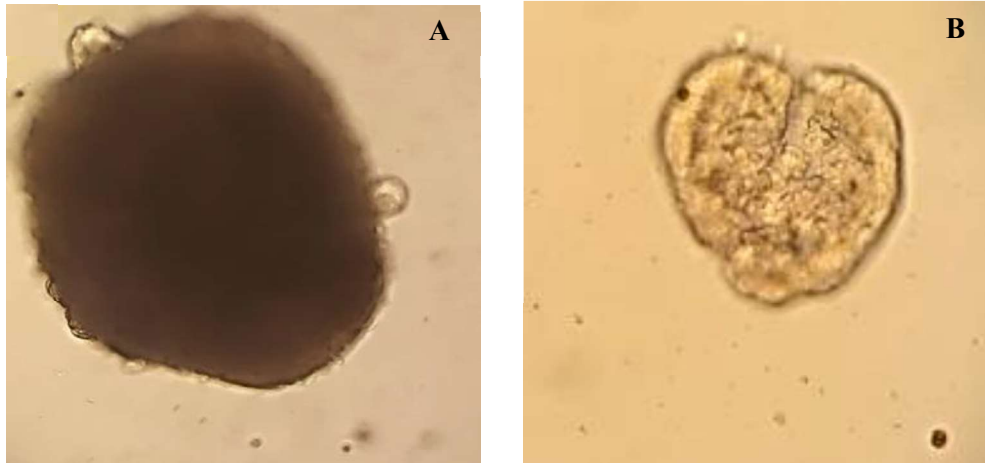


## **COLTURE PRIMARIE DA BIOPSIA DI METASTASI EPATICA DA PAZIENTI CON CARCINOMA DEL COLON-RETTO**

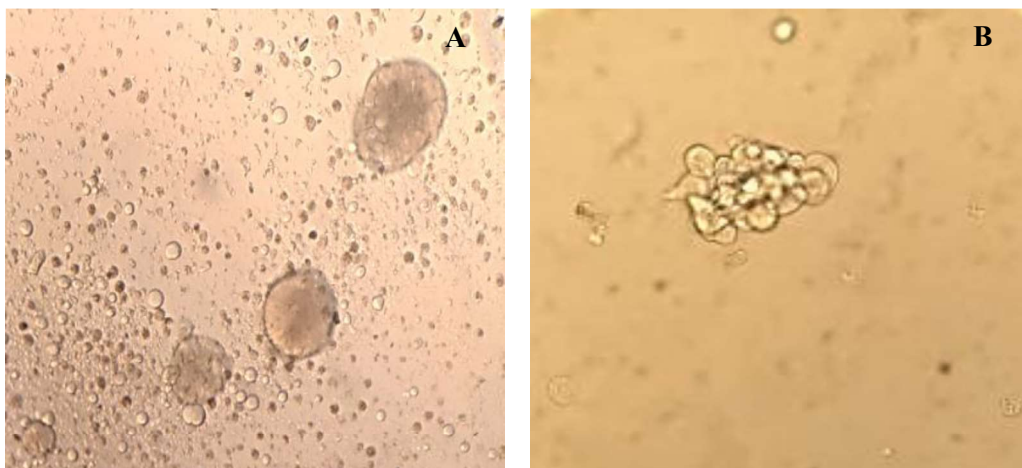
In concomitanza agli studi condotti sulle linee tumorali immortalizzate, sono state isolate le cellule da materiale bioptico proveniente da tessuto tumorale di pazienti affetti da carcinoma del colon-retto, previa approvazione da parte del Comitato Etico.

Lo scopo era quello di confrontare gli esperimenti condotti in precedenza sulle linee tumorali con le colture primarie. Tuttavia, la messa in coltura e l'isolamento cellulare non si è rivelata di facile esecuzione, a causa della scarsa attività replicativa delle cellule e della ridotta vitalità nel terreno di coltura, non in grado di mimare il microambiente tissutale delle cellule di partenza. Ulteriore svantaggio è stato che la resezione di tessuto da colon-retto causava, dopo alcuni giorni dalla messa in coltura delle cellule, una contaminazione batterica non contrastabile con gli usuali sistemi di coltura in aggiunta di una miscela di antibiotico e antifungino. Si è ipotizzato, quindi, di lavorare su neoplasie epatiche secondarie, sicuramente meno contaminate e più arricchite di cellule staminali tumorali, in quanto metastasi epatiche da carcinoma colo-rettale. Sono state isolate le cellule da tessuto metastatico epatico di due pazienti con carcinoma del colon-retto e con mutazione del gene K-RAS, messe nel terreno di coltura utilizzato per le CST e lasciate crescere per alcuni giorni. La scarsa reperibilità del materiale bioptico e la difficoltà nell'isolamento e la crescita cellulare ha rallentato gli esperimenti e la possibilità di investigare un numero corposo di pazienti, ma standardizzato il protocollo ci aspettiamo di avere un numero di campioni da esaminare più ampio.

I risultati mostrano la formazione di aggregati cellulari sferici del paziente A e del paziente B (**figura 23**), le cellule sono state successivamente disgregate meccanicamente per dividere e ampliare il numero di cellule (**figura 24**). È stato infine effettuato il saggio di immunocitochimica sulle cellule isolate dal tessuto metastatico del paziente A e sono stati investigati i livelli di espressione di CD44/LGR5 (**figura 25**) e di CD133/Notch1 (**figura 26**). Le cellule isolate dal paziente B mostrano una crescita più lenta nel mezzo di coltura utilizzato e non sono ancora un numero sufficiente per poter effettuare delle analisi. Si tratta comunque di analisi preliminari che necessitano di ulteriori approfondimenti.



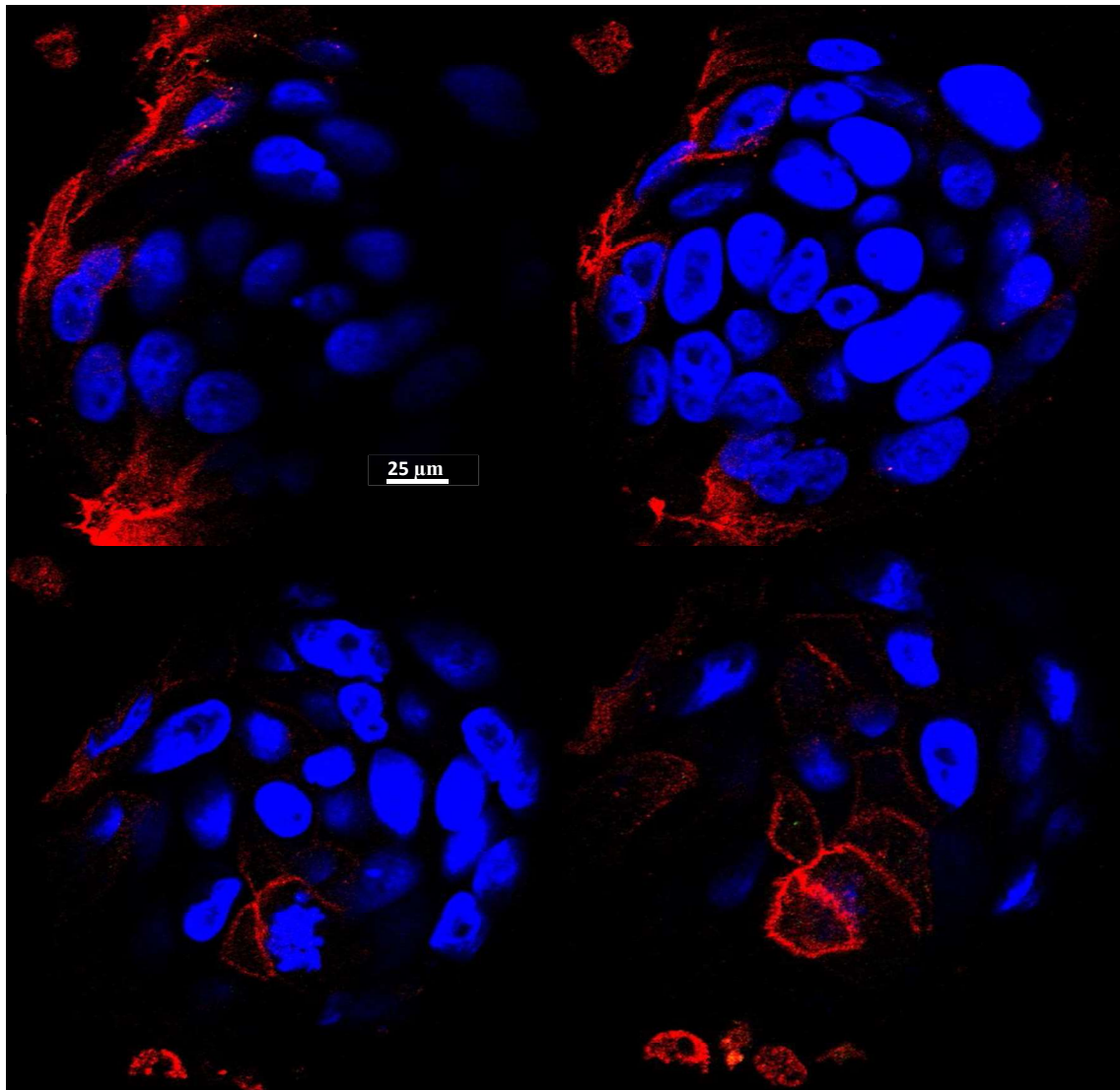
**Figura 23.** Immagini ottenute al microscopio ottico delle cellule isolate da tessuto metastatico epatico del paziente A e del paziente B. Le cellule sono state piastrate in un mezzo di cultura (DMEM F-12) arricchito con fattori di crescita e dopo qualche giorno di crescita formano degli aggregati sferici.



**Figura 24.** Immagini ottenute al microscopio ottico delle cellule isolate da tessuto metastatico epatico del paziente A e del paziente B. Le cellule sono state disgregate meccanicamente e amplificate.

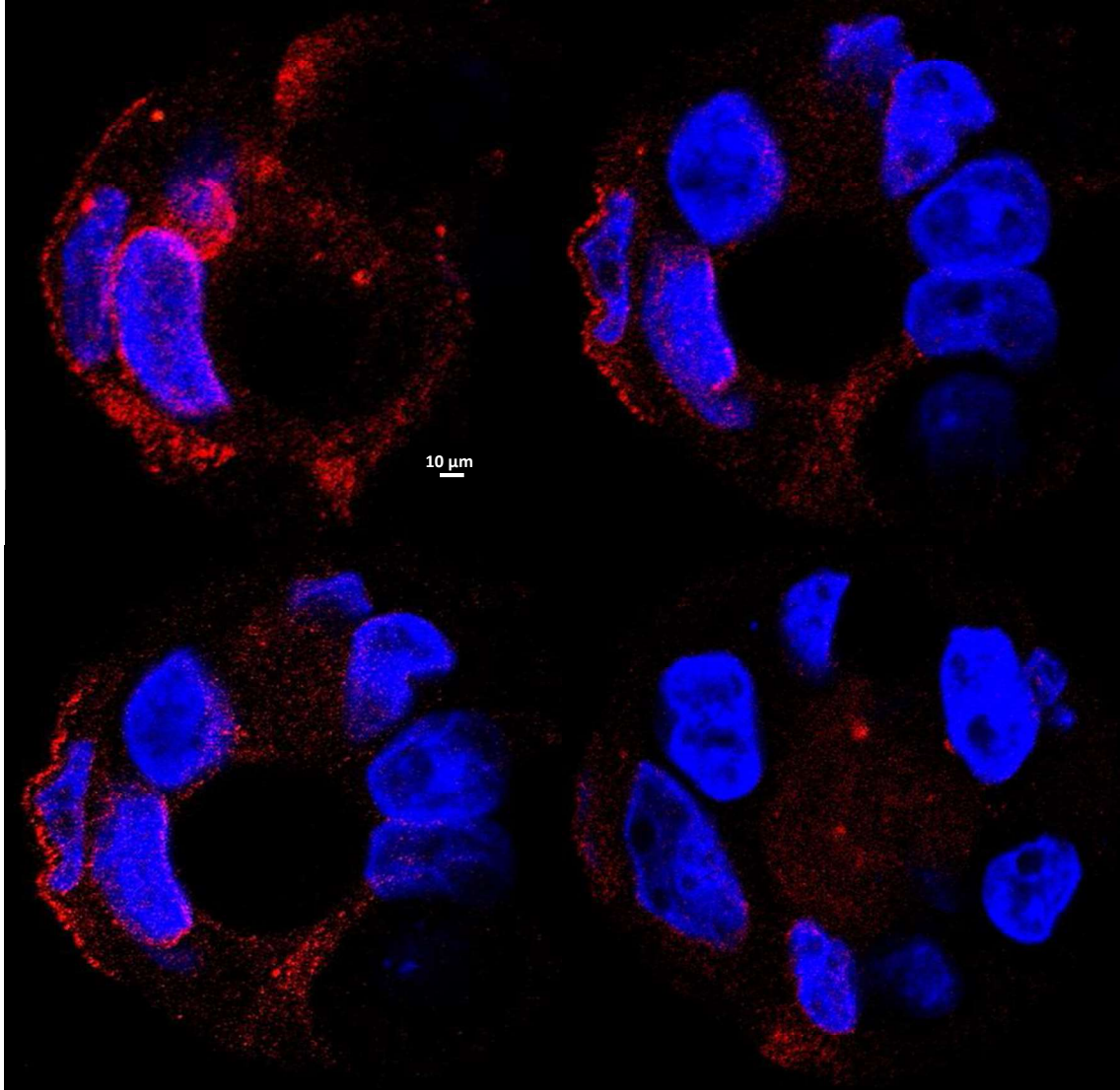
*Analisi di Immunocitochimica*

In **figura 25** sono riportati i risultati delle analisi di immunocitochimica relativamente all'espressione dei marcatori CD44 e LGR5 sulle cellule isolate dal tessuto metastatico del paziente A.



**Figura 25.** Immagini ottenute al microscopio confocale dei livelli di espressione dei marcatori CD44 (in rosso) e LGR5 (in verde) sulle cellule isolate dal tessuto metastatico del paziente A. LGR5 risulta essere poco espresso. In figura sono state riportate 4 immagini rappresentative dello Z-stack acquisito.

In **figura 26** sono riportati i risultati delle analisi di immunocitochimica relativamente all'espressione del marcatore CD133 e di Notch1 sulle cellule isolate dal tessuto metastatico del paziente A.



**Figura 26.** Immagini ottenute al microscopio confocale dei livelli di espressione dei marcatori CD133 (in rosso) e Notch-1 (in verde) sulle cellule isolate dal tessuto metastatico del paziente A. Notch-1 sembra essere non espresso o la concentrazione di anticorpo primario e/o secondario utilizzata non è ottimale sulle colture primarie. In figura sono state riportate 4 immagini rappresentative dello Z-stack acquisito.

## DISCUSSIONE

L'alta incidenza e mortalità del carcinoma del colon-retto rappresentano una sfida per la ricerca di trattamenti nuovi ed efficaci. L'eterogeneità morfologica e genotipica della malattia è resa ancor più complessa dalla presenza delle cellule staminali tumorali, le quali aiutate da diversi fattori molecolari e ambientali, provocano lo sviluppo e la diffusione della malattia, promuovendo contemporaneamente una prognosi sfavorevole a causa della resistenza ai farmaci e del rischio di recidiva<sup>2</sup>.

Le tradizionali terapie anti-tumorali, chemioterapia e radioterapia, hanno delle limitazioni che portano al fallimento del trattamento e all'insorgenza di recidive. Le stesse limitazioni riguardano le terapie termiche, terapie mini-invasive basate sull'utilizzo di calore per distruggere i tessuti tumorali<sup>3</sup>, che in ambito oncologico sono impiegate principalmente come coadiuvante di radioterapia e chemioterapia. Per ottimizzare e personalizzare le terapie termiche è necessario mettere insieme le evidenze ottenute dai dati clinici ed effettuare delle simulazioni per studiare nuovi modelli di applicazione.

Il rischio di recidiva resta però un problema sempre più attuale e la nanomedicina, con l'utilizzo di nanoparticelle, assume a tal proposito un ruolo sempre più rilevante<sup>4</sup>.

Inoltre, la combinazione di trattamenti antineoplastici convenzionali, come la doxorubicina, con terapie target specifiche risulta molto più efficace ad ostacolare la ricorrenza del tumore rispetto alle sole terapie adiuvanti<sup>5</sup>. La cardiotoxicità indotta dalla doxorubicina può essere ridotta dalla sua combinazione con l'uso di sostanze naturali e sicure, così da diminuire le dosi di doxorubicina utilizzate e potenziare l'efficacia del trattamento.

Alla luce di queste considerazioni, identificare trattamenti cosiddetti "intelligenti", rivolti contro uno specifico bersaglio molecolare, è possibile qualora il bersaglio sia presente sulla superficie della cellula tumorale/staminale tumorale e non su quella della cellula sana. La caratterizzazione delle cellule staminali tumorali è il punto di partenza per identificare i bersagli molecolari contro i quali sviluppare nuove terapie. Gli anticorpi rappresentano oggi uno degli strumenti più potenti sia da un punto di vista diagnostico sia terapeutico, infatti coniugandoli a farmaci citotossici o a metalli in forma nanometrica o colloidale (quali ad esempio particelle nanometriche di oro colloidale, nanoparticelle d'oro, coniugate con anticorpi specifici) è possibile indurre un danno localizzato a livello

molecolare attraverso la generazione di calore e agire selettivamente sulle cellule staminali tumorali.

Infatti, benchè alcuni marcatori di staminalità tumorale siano considerati altamente specifici per le CST, come anche dimostrato dai nostri esperimenti, queste proteine sono anche espresse in altri tessuti e in particolare, sono potenziali biomarcatori di cellule staminali adulte. L'overespressione di questi marcatori è indice, però, di alterazioni morfologiche e biochimiche all'interno della cellula e sono queste alterazioni che devono essere investigate per trovare target di terapia specifica.

La prima parte del mio progetto di dottorato è stata quindi quella di isolare le CST dalle due linee di adenocarcinoma del colon-retto HT-29 e CaCo-2 e caratterizzarle sulla base di alcuni marcatori di staminalità tumorale CD133, CD44 e LGR5 rispetto alle CT di partenza. Dalla caratterizzazione è risultato, anche, che CD133 ha una localizzazione differenziale tra le CaCo-2 CT e le CST; nelle CaCo-2 CT si accumula nel nucleo in maniera predominante rispetto alle CST, in cui invece è maggiormente espresso a livello citoplasmatico e sulla superficie di membrana (**figura 15a e 15b**). Le proteine transmembrana sono generalmente internalizzate per endocitosi, guidate nel citoplasma e trasportate nel nucleo da percorsi che coinvolgono specifiche proteine, le importine. Quando si sposta nel nucleo, CD133 può agire come regolatore trascrizionale interferendo con vie molecolari direttamente connesse alla proliferazione e/o alla differenziazione delle cellule tumorali. Ma l'esatto meccanismo molecolare non è chiaro e necessita di ulteriori studi<sup>109</sup>. Il ruolo di CD133 nel nucleo risulta controverso in letteratura, in alcuni tumori sembra essere correlato ad una migliore prognosi<sup>110,111</sup>, in altri invece ad una più bassa sopravvivenza<sup>112,109</sup> e ad una maggiore possibilità di sviluppare metastasi. La differente localizzazione di CD133 potrebbe influenzare l'attivazione di alcuni pathways, tra i quali i pathways di Wnt/ $\beta$ -catenina, Notch, and Hedgehog<sup>109</sup> che sono coinvolti nella progressione, crescita tumorale e nel mantenimento delle cellule staminali tumorali. La localizzazione nucleare/citoplasmatica di CD133 potrebbe assumere quindi sia un valore prognostico, correlabile allo stadio di malattia, sia terapeutico.

La localizzazione differenziale di CD133 nelle CaCo-2 CT e CST, osservata in immunocitochimica, è stata confermata anche dall'analisi di Western Blot, da cui è risultata una banda nucleare di CD133 compresa tra 80 kDa e 60 kDa (**figura 16**).

Oltre alla differente localizzazione cellulare, l'analisi di Western Blot ha mostrato anche una banda citosolica di CD133 compresa tra 25-20 kDa, non nota in letteratura. I frammenti di CD133 potrebbero essere specifici prodotti di taglio, varianti di splicing che hanno qualche ruolo nei processi cellulari, solo prodotti di degradazione oppure conseguenza di alcune modifiche post-traduzionali<sup>113,114</sup>. Questo rafforza l'idea che bisogna meglio caratterizzare CD133 poiché i suoi prodotti di taglio o le piccole isoforme di proteina potrebbero giocare un ruolo fondamentale sull'attività delle cellule staminali tumorali<sup>113</sup>. In letteratura è riportato, infatti, che le proteine transmembrana, utilizzate come markers diagnostici in diversi tipi di tumori, risultano oggi ancora poco caratterizzate, sebbene sembrano essere particolarmente coinvolte nei processi metastatici<sup>115</sup>. D'altra parte gli elevati livelli di CD133 sulla superficie delle CST rappresenterebbero un target ideale per terapie anticorpali dirette (anti-CD133) o per veicolare metalli con cui svolgere terapie termoablative specifiche per il tessuto tumorale, evitando così effetti collaterali ad altri tessuti che pure potrebbero esprimere la proteina, seppur a livelli inferiori.

La seconda parte del mio progetto di dottorato ha riguardato il trattamento delle CST con la doxorubicina, la berberina e una combinazione sinergica tra i due per studiare gli effetti sulla proliferazione, vitalità e citotossicità in maniera tempo/dose dipendente. La combinazione della berberina, alcaloide naturale con effetto adiuvante, con la doxorubicina consente di ridurre il rischio di cardiotoxicità indotto dalle alte dosi di doxorubicina<sup>100,99</sup> e potenziare l'efficacia del trattamento<sup>116,117</sup>. I risultati dei saggi MTT e BRDU hanno mostrato una ridotta capacità proliferativa delle CST dopo trattamento combinato e una maggiore mortalità, in particolare alle concentrazioni di doxorubicina 500 nM + berberina 60 uM rispetto al trattamento singolo con doxorubicina 750 nM (**grafico 4-5** e **grafico 6-7**). Questo risultato è stato confermato in immunocitochimica, in cui si osserva un ridotto numero di CST nelle colonosfere dopo trattamento combinato rispetto al controllo e ai trattamenti singoli e le CST vitali risultano particolarmente danneggiate dall'effetto sinergico del trattamento. Si osserva inoltre un'espressione di CD133 e Notch1 trattamento dipendente, che aumenta nettamente dopo trattamento combinato rispetto al controllo (**figura 17a-17b**). I risultati dell'analisi di Western Blot hanno mostrato, in particolare, un accumulo dei frammenti di CD133 (25-20 kDa) e di Notch1 (50-37 kDa) in maniera trattamento dipendente e un maggiore accumulo si

osserva nelle CST dopo trattamento combinato (**figura 18-19**). In letteratura è riportato che l'attivazione di Notch-1 richiede il rilascio proteolitico indotto da ligando del dominio intracellulare (IC)<sup>118</sup>. Il precursore del recettore Notch è una proteina di 300 kDa, il dominio transmembrana di Notch-1 (~120 kDa) viene tagliato e internalizzato e da questo si libera il dominio IC che è trasportato nel nucleo dove si associa e regola fattori trascrizionali<sup>119</sup>. L'overespressione di Notch-1 nelle CST promuove la formazione e la crescita delle tumorsfere e il silenziamento di Notch-1 inibisce la proliferazione cellulare *in vitro*<sup>120</sup>. Il trattamento con la doxorubicina sembrerebbe, però, sovvertire il ruolo anti-apoptotico<sup>121</sup> di Notch-1 nelle CST e l'attivazione del pathway di Notch doxorubicina-dipendente promuoverebbe l'apoptosi delle cellule tumorali indotta dal trattamento<sup>122</sup>. Di conseguenza l'accumulo del frammento (tra 50 kDa e 37 kDa) di Notch-1 dopo trattamento combinato, osservato nei risultati (**figura 18-19**), potrebbe mediare e rafforzare l'efficacia del trattamento favorendo l'attivazione di pathways pro-apoptotici. In letteratura è riportato che il dominio IC di Notch-1 è un substrato delle caspasi-3 e caspasi-6 in cellule di Jurkat durante l'apoptosi indotta dal trattamento con un anticorpo anti-FAS<sup>121</sup>; con l'attivazione della caspasi il dominio IC di Notch-1 (115 kDa), che contiene siti specifici riconosciuti dalle caspasi -DxxD or VxxD-, subisce un ulteriore taglio e nei lisati cellulari si osserva una riduzione della banda corrispondente al dominio IC di Notch-1 con l'accumulo di nuove bande tra cui 48 kDa e 45 kDa. I frammenti di Notch-1 mostrano una capacità ridotta di inibire l'attività di Nur77, proteina che attiva il segnale di morte cellulare, a differenza dell'IC di Notch-1 (115 kDa) che invece svolge una funzione anti-apoptotica nelle CT. Quindi la frammentazione di Notch-1 IC da parte delle caspasi comporta l'inibizione della sua attività anti-apoptotica. Per quanto riguarda invece il taglio proteolitico di CD133 non ci sono evidenze in letteratura, ma è stato osservato l'aumento di espressione di piccole varianti di CD133 in risposta ad uno stress<sup>113</sup> e questo supporta la nostra ipotesi che l'accumulo del frammento di CD133 tra 25-20 kDa in maniera trattamento-dipendente possa essere un prodotto di taglio specifico o una variante di splicing, piuttosto che un prodotto di degradazione non specifico. In letteratura è riportato, inoltre, che l'overespressione di CD133 dopo trattamento con doxorubicina svolge una funzione anti-apoptotica e regola i meccanismi di farmaco-resistenza<sup>123</sup>. Uno studio più approfondito di CD133 e dei suoi prodotti favorirebbe una maggiore comprensione della biologia delle cellule staminali tumorali e l'individuazione di nuovi target terapeutici probabilmente coinvolti nei processi di



metastattizzazione e nella comparsa di recidive. Complessivamente i dati indicano che la berberina rappresenta un potenziale adiuvante terapeutico per il CCR in aggiunta alla doxorubicina sia per aumentare la citotossicità selettiva sul tumore, riducendo o ritardando le potenziali recidive, sia per ridurre i dosaggi di doxorubicina, considerati l'incidenza e/o la gravità degli effetti collaterali della doxorubicina che sovente costringono a sospendere il trattamento. L'effetto adiuvante, inoltre, consente, stimolando vie di segnale differenti, di ridurre l'incidenza di resistenze alla chemioterapia, migliorando potenzialmente gli outcome clinici.

Successivamente sono state isolate le vescicole extracellulari dalle HT-29 e CaCo-2 CT e CST e caratterizzate sulla base dell'espressione dei marcatori di staminalità tumorale. L'accumulo dei piccoli frammenti citoplasmatici di CD133 osservati nei lisati proteici delle CT e CST ha sollevato l'ipotesi di un possibile ricircolo di tali frammenti nelle vescicole extracellulari. L'espressione di proteine nelle vescicole extracellulari è potenzialmente correlata alla comunicazione cellula-cellula e cellula-matrice e alla progressione tumorale<sup>124</sup>. I risultati hanno mostrato, come ipotizzato, la presenza di piccoli frammenti di CD133 e di CD44 nelle vescicole extracellulari isolate sia dalle CT sia dalle CST e un maggiore accumulo di questi frammenti si osserva nelle CST rispetto alle CT (**figura 20a- 20b**). Sebbene non sia noto nello specifico il ruolo dei frammenti di CD133 né a livello intracellulare né intravescicolare, in letteratura è riportato che le microvescicole contenenti CD133 (~130 kDa) promuovono la migrazione e l'invasione cellulare<sup>124,125</sup>. La presenza di CD133 nelle microvescicole induce chemioresistenza, abolendo gli effetti inibitori dei farmaci anti-EGFR sulla proliferazione cellulare e sulla progressione tumorale. Questi risultati suggeriscono che CD133 agisce come un nuovo modulatore nel rilascio delle microvescicole e nel traffico delle oncoproteine. CD133 diventa, quindi, un target terapeutico nel trattamento del cancro del colon anti-EGFR resistente<sup>125</sup>. Nel cancro del pancreas, invece, è il profilo di glicosilazione di CD133 veicolato all'interno delle vescicole extracellulari ad assumere un valore prognostico, in quanto è stata trovata una correlazione significativa tra l'aumento della glicosilazione di CD133 e una maggiore sopravvivenza dei pazienti<sup>126</sup>. Questo sottolinea che CD133 circola all'interno delle vescicole extracellulari in diverse forme, forma intera (~130 kDa), più o meno glicosilata e sotto forma di piccoli frammenti come si evince dai nostri dati.

Allo stesso modo, l'espressione di CD44 nelle vescicole extracellulari isolate da diversi tipi di cellule tumorali favorisce la progressione tumorale<sup>127,128</sup>.

Nel cancro ovarico il trasporto di CD44 nelle vescicole extracellulari induce una riprogrammazione cellulare attraverso la transizione epitelio-mesenchimale, promuovendo processi di invasione e metastasi<sup>129</sup>.

Inoltre, dati preliminari sulle vescicole extracellulari isolate dalle CaCo-2 CST dopo trattamento con doxorubicina, berberina e la combinazione sinergica dei due hanno mostrato un aumento dei frammenti di CD133 e CD44 in particolare dopo trattamento combinato rispetto al controllo (**figura 21**). In letteratura è riportato che l'accumulo di CD44 e altre proteine negli esosomi da cellule tumorali dopo trattamento con la doxorubicina induce meccanismi di chemioresistenza, poichè gli esosomi trasportano e consegnano queste proteine alle cellule tumorali adiacenti per indurre resistenza al trattamento e favorire la progressione tumorale<sup>130,131</sup>. Attualmente non conosciamo il significato clinico, prognostico o terapeutico della presenza dei frammenti di CD133 e di CD44 dopo trattamento con doxorubicina e berberina nelle vescicole extracellulari delle CST. Sono sicuramente necessari studi approfonditi per comprenderne il significato. Il fatto che nelle vescicole post-trattamento siano presenti frammenti dei recettori potrebbe significare che la terapia abbia un'efficacia anche nel ridurre il signaling mediato da CD133 e CD44 attraverso le vescicole extracellulari, che normalmente trasportano i recettori nella forma intera e non frammentata. Apparentemente quindi il nostro ritrovato potrebbe rappresentare un marcatore periferico dell'efficacia terapeutica. Tuttavia, non essendo ancora chiaro il messaggio veicolato dalle vescicole extracellulari (chemioresistenza, signalling proliferativo-differenziativo) occorrerebbe investigare in primis questi aspetti per poter meglio comprendere il ruolo che i farmaci usati nel nostro studio hanno nella segnalazione intercellulare mediata dalle vescicole.

Infine, è stato analizzato il ruolo della ECM sull'adesione cellulare e sull'espressione dei marcatori di staminalità tumorale. Le CST, in sospensione nel loro mezzo di coltura, mostravano una scarsa capacità di adesione se non piastrate sul vetrino funzionalizzato con concentrazioni di matrigel piuttosto elevate. Inoltre, non tutte le colonsfere aderivano correttamente al substrato e una parte di queste venivano perse durante il saggio di immunocitochimica. Per ovviare a queste limitazioni e per confrontare il matrigel (ricco di fattori: collagene di tipo IV, entactina, proteoglicano eparan solfato, laminina) con un

substrato di adesione più specifico per le CT e le CST, in collaborazione con il Prof. Fusco, si è pensato di realizzare substrati 2D funzionalizzati solo con il collagene e che mimassero le caratteristiche meccaniche della ECM sana (1.3 kPa) e tumorale (30 kPa). Tali esperimenti sono stati svolti presso il DICMaPI dell'Università degli Studi di Napoli diretto dal Prof. Netti. I risultati hanno mostrato una maggiore adesione cellula/ECM e cellula/cellula delle CST su collagene 1,3 kPa e in particolare su collagene 30 kPa; invece l'espressione dei marcatori di staminalità tumorale CD133 e LGR5 è risultata ridotta sia nelle CT che nelle CST rispetto al matrigel di controllo (**figura 22a e 22b**). In letteratura è riportato che la migrazione cellulare può essere controllata da una serie di fattori fisici e biochimici, tra cui la rigidità della matrice extracellulare e la stabilità delle giunzioni cellula-cellula e che la diffusione delle CST dipende in maniera cruciale dalla E-caderina, fondamentale molecola di adesione. Tuttavia, cambiando la rigidità del microambiente, ad esempio la densità della matrice di collagene che circonda le cellule, è possibile anche indurre un cambiamento nella modalità di migrazione delle cellule<sup>132,133</sup>. La composizione del substrato svolge, inoltre, un ruolo fondamentale nella progressione tumorale, infatti sul matrigel le cellule tumorali proliferano rapidamente e sono in grado di invadere il gel, rievocando *in vitro* il loro comportamento *in vivo*. Quando le cellule tumorali vengono iniettate nei topi con matrigel, la frequenza di formazione del tumore e il loro tasso di crescita sono superiori a quelli osservati quando le cellule tumorali vengono iniettate da sole, presumibilmente a causa di un aumentato processo di angiogenesi e di soppressione dell'apoptosi delle cellule tumorali mediata dal matrigel stesso. Il principale limite del matrigel è rappresentato dal ruolo incerto dei suoi componenti sulle attività cellulari e dalla variabilità da lotto a lotto<sup>134</sup>. Pertanto, l'utilizzo di un substrato, come il collagene, potrebbe risultare più sicuro e standardizzato e garantire una maggiore adesione delle colonsfere *in vitro*.

Durante il percorso di dottorato si è cercato, inoltre, di isolare CST da biopsie di adenocarcinoma del colon-retto al fine di confrontare la morfologia, l'adesione cellula/cellula e cellula/ECM e l'espressione dei marcatori di staminalità tumorale tra le linee immortalizzate e le colture primarie. Nonostante i numerosi tentativi, non si è riuscito ad ottenere colture primarie. Si è provato quindi, in alternativa, ad isolare le CST da due biopsie di metastasi epatiche di pazienti con adenocarcinoma del colon-retto e questo secondo tentativo è risultato efficiente. I tempi di crescita delle colture primarie è

risultato piuttosto lento e difficoltoso e non è stato possibile amplificare un numero cospicuo di cellule su cui poter effettuare diverse prove sperimentali per avere una significatività statistica. Risultati preliminari di immunocitochimica sulle colture primarie di metastasi epatiche di uno dei due pazienti analizzati hanno mostrato che c'è una corrispondenza morfologica, di adesione e di espressione dei marcatori CD44 e CD133 con le linee immortalizzate, ma non del marcatore LGR5 (**figura 25**), che infatti in letteratura è noto come marcatore specifico delle colonsfere da adenocarcinoma del colon-retto. L'espressione di CD44 sembra più marcata rispetto a CD133. Inoltre, nessuna delle cellule all'interno delle colonsfere primarie (**figura 26**) mostra una netta localizzazione nucleare di CD133, come osservato nelle CaCo-2 CT. Questo ci permette di ipotizzare che la localizzazione di CD133 assume un valore prognostico, con una prognosi migliore se è nucleare (tumore primario) e sfavorevole se è espresso sulla superficie cellulare (tumore metastatico). Inoltre, la localizzazione di superficie potrebbe rappresentare un target terapeutico ottimale per anticorpi specifici anti-CD133. Queste ipotesi devono trovare conferma analizzando un maggior numero di pazienti, ma i risultati sembrano incoraggianti e aprono prospettive future sull'utilizzo di trattamenti quanto più selettivi che abbiano come target le CST, principale causa di ricorrenza tumorale.

Quindi, una maggiore caratterizzazione delle CST risulta fondamentale per comprendere meglio il comportamento della popolazione staminale tumorale e individuare target specifici su cui agire sia per prevenire la formazione di metastasi sia per trattare tumori metastatici ad uno stadio già avanzato. Limite dello studio è rappresentato dall'assenza di esperimenti *in vivo*, che confermino la capacità delle CST isolate e amplificate *in vitro* di indurre la formazione tumorale. Tra le prospettive future rientrano, quindi, lo studio di proteomica differenziale tra le CT e CST per approfondire la caratterizzazione cellulare, l'analisi *in vivo* per confermare i dati *in vitro* e l'individuazione di possibili terapie innovative target-specifiche. In conclusione:

1. Le CST sono state caratterizzate per la formazione delle colonsfere e per l'espressione dei marcatori CD133, CD44 e LGR5.
2. È stata osservata una localizzazione nucleare di CD133 nelle CaCo-2 CT rispetto ad una localizzazione di superficie nelle CaCo-2 CST.

3. Il trattamento combinato doxorubicina/berberina è risultato efficace sulle CST, con un effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico, favorendo una riduzione delle concentrazioni di doxorubicina rispetto al trattamento singolo.
4. È stato osservato, nei lisati delle CST, un accumulo di frammenti di CD133, non noti in letteratura, e di Notch-1 in maniera trattamento-dipendente.
5. Nelle vescicole extracellulari isolate dalle CST è risultato un ricircolo dei frammenti di CD133 e di CD44 e un loro accumulo, in particolare dopo trattamento combinato.

Lo studio apre, quindi, una finestra sulla necessità di approfondire la conoscenza dei principali marcatori di staminalità tumorale, in particolare di CD133 ancora poco investigato; una maggiore caratterizzazione dei marcatori permetterebbe l'individuazione di nuovi target terapeutici e vie di segnalazione rilevanti. Gli aspetti innovativi di questo studio sono rappresentati dalla localizzazione superficiale di CD133 nelle CST per agire in maniera selettiva con terapie anticorpo-coniugato anti-CD133, dall'efficacia del trattamento combinato doxorubicina/berberina sulle CST e dall'accumulo dei frammenti di CD133, Notch-1 e CD44 nei lisati cellulari e nelle vescicole extracellulari in maniera trattamento-dipendente, come potenziali modulatori dei meccanismi di chemioresistenza.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ghoncheh, M., Mohammadian, M., Mohammadian-Hafshejani, A. & Salehiniya, H. The Incidence and Mortality of Colorectal Cancer and Its Relationship With the Human Development Index in Asia. *Ann. Glob. Heal.* **82**, 726–737 (2016).
2. Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F. & Wang, H. L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J. Gastrointest. Oncol.* **3**, 153–173 (2012).
3. Neo, J. H. *et al.* Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer* **10**, (2010).
4. Markowitz, S. D. & Bertagnolli, M. M. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2449–2460 (2009).
5. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 7–30 (2016).
6. Sanford D. Markowitz, M.D., Ph.D. and Monica M. Bertagnolli, M. D. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N ENGL J MED* **361**, 2449–2460 (2009).
7. Hoeijmakers, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. **361**, 1475–1485 (2009).
8. Tariq, K. & Ghias, K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol. Med.* **13**, 120–135 (2016).
9. Ricci-Vitiani, L., Fabrizio, E., Palio, E. & De Maria, R. Colon cancer stem cells. *J. Mol. Med.* **87**, 1097–1104 (2009).
10. Munro, M. J., Wickremesekera, S. K., Peng, L., Tan, S. T. & Itinteang, T. Cancer stem cells in colorectal cancer: A review. *J. Clin. Pathol.* **71**, 110–116 (2018).
11. Humphries, A. & Wright, N. A. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 415–424 (2008).
12. van der Wath, R. C., Gardiner, B. S., Burgess, A. W. & Smith, D. W. Cell Organisation in the Colonic Crypt: A Theoretical Comparison of the Pedigree and Niche Concepts. *PLoS One* **8**, (2013).
13. Sato, T. *et al.* Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**, 415–418 (2011).
14. Shih, I. M. *et al.* Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2640–2645 (2001).
15. NATHAN & LANE, M.D., AND ROBERT LEV, M. D. C. Observations on the origin of adenomatous epithelium of the colon. *Cancer* **16**, 751–764 (1963).

16. Reserve, W. Studies on the morphogenesis of adenomatous polyps in the human colon. *Cancer* **16**, 998–1002 (1963).
17. Maskens, A. P. Histogenesis of adenomatous polyps in the human large intestine. *Gastroenterology* **77**, 1245–1251 (1979).
18. Shang, S., Hua, F. & Hu, Z. W. The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: Therapeutic opportunities. *Oncotarget* **8**, 33972–33989 (2017).
19. He, T. C. *et al.* Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* (80-. ). **281**, 1509–1512 (1998).
20. Yuan, S. *et al.* Role of Wnt/  $\beta$ -Catenin Signaling in the Chemoresistance Modulation of Colorectal Cancer. *Biomed Res. Int.* **2020**, (2020).
21. Gooding, J. M., Yap, K. L. & Ikura, M. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: New insights from three-dimensional structures. *BioEssays* **26**, 497–511 (2004).
22. Van Roy, F. & Berx, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3756–3788 (2008).
23. Tsanou, E., Peschos, D., Batistatou, A., Charalabopoulos, A. & Charalabopoulos, K. The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res.* **28**, 3815–3826 (2008).
24. Amado, R. G. *et al.* Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626–1634 (2008).
25. Malumbres, M. & Barbacid, M. RAS oncogenes: The first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 459–465 (2003).
26. Abramo, J. M. *et al.* Individuality in music performance. *Assess. Eval. High. Educ.* **37**, 435 (2012).
27. Munro, A. J., Lain, S. & Lane, D. P. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: A systematic review. *Br. J. Cancer* **92**, 434–444 (2005).
28. Kreso, A. & Dick, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* **14**, 275–291 (2014).
29. Zheng, S., Xin, L., Liang, A. & Fu, Y. Cancer stem cell hypothesis: A brief summary and two proposals. *Cytotechnology* **65**, 505–512 (2013).
30. Ashokachakkaravarthy, K. & Pottakkat, B. Mitotic quiescence in hepatic cancer stem cells: An incognito mode. *Oncol. Rev.* **14**, 9–16 (2020).
31. Matthew J Munro, Agadha C Wickremesekera, Paul F Davis, Reginald Marsh, S. T. T. &

- and Tinte Itinteang. Renin-angiotensin system and cancer: A review. *Integr. Cancer Sci. Ther. Integr Cancer Sci Ther.* **4**, 1–6 (2017).
32. Chen, W., Dong, J., Haiech, J., Kilhoffer, M. C. & Zeniou, M. Cancer stem cell quiescence and plasticity as major challenges in cancer therapy. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
  33. Dontu, G. *et al.* Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res.* **6**, (2004).
  34. Zhiwei Wang, Yiwei Li, Sanjeev Banerjee, and F. H. S. Emerging Role of Notch in Stem Cells and Cancer. *Cancer Lett.* **279**, 8–12 (2009).
  35. Christian, L. M. The ADAM family insights into Notch proteolysis. *Fly (Austin)*. **6**, 30–34 (2012).
  36. Yuan, X. *et al.* Notch signaling: An emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Lett.* **369**, 20–27 (2015).
  37. Radtke, F., Clevers, H. & Riccio, O. From Gut Homeostasis to Cancer. *Curr. Mol. Med.* **6**, 275–289 (2006).
  38. Riccio, O. *et al.* Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep.* **9**, 377–383 (2008).
  39. Rangarajan, A. *et al.* Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J.* **20**, 3427–3436 (2001).
  40. Nair, P., Somasundaram, K. & Krishna, S. Activated Notch1 Inhibits p53-Induced Apoptosis and Sustains Transformation by Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncogenes through a PI3K-PKB/Akt-Dependent Pathway. *J. Virol.* **77**, 7106–7112 (2003).
  41. Sade, H., Krishna, S. & Sarin, A. The Anti-apoptotic Effect of Notch-1 Requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated Signaling in T Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 2937–2944 (2004).
  42. Hadjimichael, C. *et al.* Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J. Stem Cells* **7**, 1150–84 (2015).
  43. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
  44. Zacchigna, S. *et al.* Loss of the cholesterol-binding protein Prominin-1/CD133 causes disk dysmorphogenesis and photoreceptor degeneration. *J. Neurosci.* **29**, 2297–2308



- (2009).
45. Fargeas, C. A. *et al.* Identification of novel prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis. *J. Cell Sci.* **117**, 4301–4311 (2004).
  46. Fargeas, C. A., Huttner, W. B. & Corbeil, D. Nomenclature of prominin-1 (CD133) splice variants - An update. *Tissue Antigens* **69**, 602–606 (2007).
  47. Florek, M. *et al.* Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res.* **319**, 15–26 (2005).
  48. Carter, D. A., Dick, A. D. & Mayer, E. J. CD133+ adult human retinal cells remain undifferentiated in Leukaemia Inhibitory Factor (LIF). *BMC Ophthalmol.* **9**, (2009).
  49. Maw, M. A. *et al.* A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 27–34 (2000).
  50. Florek, M. *et al.* Prominin-2 is a cholesterol-binding protein associated with apical and basolateral plasmalemmal protrusions in polarized epithelial cells and released into urine. *Cell Tissue Res.* **328**, 31–47 (2007).
  51. Yu, X. *et al.* CD133, stem cells, and cancer stem cells: Myth or reality? *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **7**, 253–259 (2011).
  52. Fargeas, C. A., Karbanová, J., Jászai, J. & Corbeil, D. CD133 and membrane micro domains: Old facets for future hypotheses. *World J. Gastroenterol.* **17**, 4149–4152 (2011).
  53. Miraglia, S. *et al.* A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: Isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* **90**, 5013–5021 (1997).
  54. Lauc, G., Rudan, I., Campbell, H. & Rudd, P. M. Complex genetic regulation of protein glycosylation. *Mol. Biosyst.* **6**, 329–335 (2010).
  55. Reis, C. A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C. & David, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J. Clin. Pathol.* **63**, 322–329 (2010).
  56. Jang, J. W., Song, Y., Kim, S. H., Kim, J. & Seo, H. R. Potential mechanisms of CD133 in cancer stem cells. *Life Sci.* **184**, 25–29 (2017).
  57. Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111–115 (2007).
  58. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106–110 (2007).

59. Huang, E. H. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* **69**, 3382–3389 (2009).
60. Kemper, K. *et al.* The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res.* **70**, 719–729 (2010).
61. Todaro, M. *et al.* Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell* **1**, 389–402 (2007).
62. Iczkowski, K. A. Cell adhesion molecule CD44: Its functional roles in prostate cancer. *Am. J. Transl. Res.* **3**, 1–7 (2011).
63. Knudson, W. & Peterson, R. S. The Hyaluronan Receptor: CD44. *Chem. Biol. Hyaluronan* **298**, 83–123 (2004).
64. Sneath, R. J. S. & Mangham, D. C. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *J. Clin. Pathol. - Mol. Pathol.* **51**, 191–200 (1998).
65. Senbanjo, L. T. & Chellaiah, M. A. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, (2017).
66. Dalerba, P. *et al.* Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10158–10163 (2007).
67. Basakran, N. S. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med. J.* **36**, 273–279 (2015).
68. Du, L. *et al.* CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6751–6760 (2008).
69. Shmelkov, S. V. *et al.* CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133 + and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J. Clin. Invest.* **118**, 2111–2120 (2008).
70. Dzwonek, J. & Wilczyński, G. M. CD44: Molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–9 (2015).
71. Kumar, K. K., Burgess, A. W. & Gulbis, J. M. Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells. *Protein Sci.* **23**, 551–565 (2014).
72. Xu, L., Lin, W., Wen, L. & Li, G. Lgr5 in cancer biology: Functional identification of Lgr5 in cancer progression and potential opportunities for novel therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 1–9 (2019).

73. Barker, N. *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* **449**, 1003–1007 (2007).
74. Shimokawa, M. *et al.* Visualization and targeting of LGR5 + human colon cancer stem cells. *Nature* **545**, 187–192 (2017).
75. Siemann, D. W. Tumor Microenvironment. *Tumor Microenviron.* (2010). doi:10.1002/9780470669891
76. Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M. & Barbarisi, A. From Cell-ECM Interactions to Tissue Engineering. *J. Cell. Physiol.* **199**, 174–180 (2004).
77. Fabian Spill, Daniel S. Reynolds, Roger D. Kamm, and M. H. Z. Impact of the Physical Microenvironment on Tumor Progression and Metastasis. *CURR OPIN BIOTECHNOL* **40**, 1–15 (2017).
78. Laura M. Doyle and Michael ZhuoWang. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *CELLS* **8**, 1–24 (2019).
79. Jeppesen, D. K. *et al.* Reassessment of Exosome Composition. *Cell* **177**, 428–445.e18 (2019).
80. Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G. & Bonnerot, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* **17**, 879–887 (2005).
81. Akers, J. C. *et al.* miR-21 in the Extracellular Vesicles (EVs) of Cerebrospinal Fluid (CSF): A Platform for Glioblastoma Biomarker Development. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
82. Walker, S. *et al.* Extracellular vesicle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Theranostics* **9**, 8001–8017 (2019).
83. Villa, A. *et al.* Transplantation of autologous extracellular vesicles for cancer-specific targeting. *Theranostics* **11**, 2034–2047 (2021).
84. Garofalo, M. *et al.* Cancer-derived EVs show tropism for tissues at early stage of neoplastic transformation. *Nanotheranostics* **5**, 1–7 (2021).
85. Neuman, H. B. *et al.* Surgical treatment of colon cancer in patients aged 80 years and older: Analysis of 31,574 patients in the SEER-Medicare database. *Cancer* **119**, 639–647 (2013).
86. Barni, S. *et al.* Agreement between oncology guidelines and clinical practice in Italy: The ‘right’ program. A project of the Italian Association of Medical Oncology (AIOM). *Ann. Oncol.* **18**, vi179-vi184 (2007).

87. Mennini, F. S. *et al.* Terapia orale vs terapia infusione nel trattamento del cancro del colon retto localmente avanzato o avanzato. *PharmacoEconomics - Ital. Res. Artic.* **14**, 121–129 (2012).
88. Schuster, H. & Kopf, H. Thermoablation: a new treatment option to replace surgical intervention? *Memo - Mag. Eur. Med. Oncol.* **8**, 242–246 (2015).
89. Camacho, J. C., Petre, E. N. & Sofocleous, C. T. Thermal Ablation of Metastatic Colon Cancer to the Liver. *Semin. Intervent. Radiol.* **36**, 310–318 (2019).
90. Wei, S. V. and X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine* **7**, 597–615 (2013).
91. Madkour, L. H. Nucleic acid medicines as green novel anticancer drugs. *Nucleic Acids as Gene Anticancer Drug Deliv. Ther.* 131–149 (2019). doi:10.1016/b978-0-12-819777-6.00010-x
92. Aghebati-Maleki, A. *et al.* Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *J. Cell. Physiol.* **235**, 1962–1972 (2020).
93. Attia, M. F., Anton, N., Wallyn, J., Omran, Z. & Vandamme, T. F. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J. Pharm. Pharmacol.* **71**, 1185–1198 (2019).
94. Khazir, J., Riley, D. L., Pilcher, L. A., De-Maayer, P. & Mir, B. A. Anticancer agents from diverse natural sources. *Nat. Prod. Commun.* **9**, 1655–1669 (2014).
95. Wen, C., Wu, L., Fu, L., Zhang, X. & Zhou, H. Berberine enhances the anti-tumor activity of tamoxifen in drug-sensitive MCF-7 and drug-resistant MCF-7/TAM cells. *Mol. Med. Rep.* **14**, 2250–2256 (2016).
96. Yahuafai, J., Asai, T., Oku, N. & Siripong, P. Anticancer efficacy of the combination of berberine and PEGylated liposomal doxorubicin in meth a sarcoma-bearing mice. *Biol. Pharm. Bull.* **41**, 1103–1106 (2018).
97. Rivankar, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.* **10**, 853–858 (2014).
98. Mordente, A. *et al.* Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: Biochemical aspects and pharmacologic implications. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 989–998 (2003).
99. Zhao, L. & Zhang, B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
100. Csapo, M. & Lazar, L. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: Pathophysiology and

- prevention. *Clujul Med.* **87**, 135–142 (2014).
101. Teiten, M. H., Gaascht, F., Dicato, M. & Diederich, M. Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 1239–1247 (2013).
  102. Tillhon, M., Guamán Ortiz, L. M., Lombardi, P. & Scovassi, A. I. Berberine: New perspectives for old remedies. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 1260–1267 (2012).
  103. Zhang, X. *et al.* Degradation of MDM2 by the interaction between berberine and DAXX leads to potent apoptosis in MDM2-overexpressing cancer cells. *Cancer Res.* **70**, 9895–9904 (2010).
  104. Liu, Q. *et al.* Berberine radiosensitizes human esophageal cancer cells by downregulating homologous recombination repair protein RAD51. *PLoS One* **6**, (2011).
  105. Jiansha Li, Lubing Gu, Hailong Zhang, Tao Liu, Dan Tian, Muxiang Zhou, and S. & Zhou. Berberine represses DAXX gene transcription and induces cancer cell apoptosis. *Lab Invest.* **93**, 354–364 (2013).
  106. Sun, Y., Xun, K., Wang, Y. & Chen, X. A systematic review of the anticancer properties of berberine, a natural product from Chinese herbs. *Anticancer. Drugs* **20**, 757–769 (2009).
  107. Tropepe, V. *et al.* Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev. Biol.* **208**, 166–188 (1999).
  108. Visioli, A. *et al.* Stemness underpinning all steps of human colorectal cancer defines the core of effective therapeutic strategies. *EBioMedicine* **44**, 346–360 (2019).
  109. Huang, M., Zhu, H., Feng, J., Ni, S. & Huang, J. High CD133 expression in the nucleus and cytoplasm predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Dis. Markers* **2015**, (2015).
  110. Chen, Y. L. *et al.* The effects of the location of cancer stem cell marker CD133 on the prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *BMC Cancer* **17**, 1–9 (2017).
  111. Lee, Y. M., Yeo, M. K., Seong, I. O. & Kim, K. H. Nuclear expression of CD133 is associated with good prognosis in patients with colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res.* **38**, 4819–4826 (2018).
  112. Cantile, M. *et al.* Nuclear localization of cancer stem cell marker CD133 in triple-negative breast cancer: A case report. *Tumori* **99**, 245–250 (2013).
  113. Taryn I. Osmond, kate w. r. B. and melanie j. M. Glioblastoma cells negative for the anti-CD133 antibody AC133 express a truncated variant of the CD133 protein. *Int. J.*

- Mol. Med.* **25**, 883–888 (2010).
114. Kemper, K. *et al.* The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res.* **70**, 719–729 (2010).
  115. Marx, S. *et al.* Transmembrane (TMEM) protein family members: Poorly characterized even if essential for the metastatic process. *Semin. Cancer Biol.* **60**, 96–106 (2020).
  116. Liu, X. *et al.* Berberine inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via COX-2/PGE2 mediated JAK2/STAT3 signaling pathway. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
  117. Pan, Y. *et al.* Berberine enhances chemosensitivity and induces apoptosis through dose-orchestrated AMPK signaling in breast cancer. *J. Cancer* **8**, 1679–1689 (2017).
  118. Schroeter, E. H., Kisslinger, J. a & Kopan, R. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* **393**, 382–386 (1998).
  119. Christel Brou, Frederique Logeat, Neetu Gupta, Christine Bessia, Odile LeBail, Ana Cumano, Pascal Roux, R. A. B. and A. I. A Novel Proteolytic Cleavage Involved in Notch Signaling: The Role of the Disintegrin-Metalloprotease TACE. in *Molecular Cell* 207–216 (Molecular Cell, 2000). doi:10.1016/s1097-2765(00)80417-7
  120. Zhang, Y., Li, B., Ji, Z. Z. & Zheng, P. S. Notch1 regulates the growth of human colon cancers. *Cancer* **116**, 5207–5218 (2010).
  121. Cohen, L. Y. *et al.* Notch1 antiapoptotic activity is abrogated by caspase cleavage in dying T lymphocytes. *Cell Death Differ.* **12**, 243–254 (2005).
  122. Huang, Z. *et al.* Notch signaling pathway mediates Doxorubicin-driven apoptosis in cancers. *Cancer Manag. Res.* **10**, 1439–1448 (2018).
  123. James M. Angelastro<sup>1, 2, \*</sup> and Michael W. Lamé<sup>1</sup>. Overexpression Of CD133 Promotes Drug Resistance In C6 Glioma Cells. *Mol Cancer Res.* **8**, 1105–1115 (2010).
  124. Marimpietri, D. *et al.* Proteome Profiling of Neuroblastoma-Derived Exosomes Reveal the Expression of Proteins Potentially Involved in Tumor Progression. *PLoS One* **8**, (2013).
  125. Kang, M., Kim, S. & Ko, J. Roles of CD133 in microvesicle formation and oncoprotein trafficking in colon cancer. *FASEB J.* **33**, 4248–4260 (2019).
  126. Sakaue, T. *et al.* Glycosylation of ascites-derived exosomal CD133: a potential prognostic biomarker in patients with advanced pancreatic cancer. *Med. Mol. Morphol.* **52**, 198–208 (2019).
  127. Szatanek, R. & Baj-Krzyworzeka, M. Cd44 and tumor-derived extracellular vesicles (Tevs). possible gateway to cancer metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–17 (2021).

128. Wang, Z., Au, A. von, Schnölzer, M., Hackert, T. & Zöller, M. CD44v6-competent tumor exosomes promote motility, invasion and cancer-initiating cell marker expression in pancreatic and colorectal cancer cells. *Oncotarget* **7**, 55409–55436 (2016).
129. Nakamura, K. *et al.* Exosomes promote ovarian cancer cell invasion through transfer of CD44 to peritoneal mesothelial cells. *Mol. Cancer Res.* **15**, 78–92 (2017).
130. Wang, X. *et al.* Enrichment of CD44 in Exosomes From Breast Cancer Cells Treated With Doxorubicin Promotes Chemoresistance. *Front. Oncol.* **10**, 1–12 (2020).
131. Bigagli, E., Cinci, L., D'Ambrosio, M. & Luceri, C. Transcriptomic characterization, chemosensitivity and regulatory effects of exosomes in spontaneous EMT/MET transitions of breast cancer cells. *Cancer Genomics and Proteomics* **16**, 163–173 (2019).
132. Ilina, O. *et al.* Cell–cell adhesion and 3D matrix confinement determine jamming transitions in breast cancer invasion. *Nat. Cell Biol.* **22**, 1103–1115 (2020).
133. Panzetta V., La Verde G. *et al.* Investigation of Biophysical Migration Parameters for Normal Tissue and Metastatic Cancer Cells After Radiotherapy Treatment. *Front. Phys* (2020).
134. Funaki, M. & Janmey, P. A. Technologies to Engineer Cell Substrate Mechanics in Hydrogels. *Biol. Eng. Stem Cell Niches* 363–373 (2017). doi:10.1016/B978-0-12-802734-9.00023-8.