

2008/2011

Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia Vittorio Erspamer

Dottorato in Farmacologia

XXIV Ciclo

Titolo della tesi

Il ruolo del recettore metabotropico del glutammato sottotipo 3 nei meccanismi di chemio resistenza agli agenti alchilanti, in cellule staminali di glioblastoma multiforme

Dottorando Cristiano Niccolini

Relatrice. Prof.ssa Daniela Melchiorri

INDICE:

CAPITOLO 1: Il Glioblastoma Multiforme	1
Sviluppo del Glioblastoma Multiforme	2
Terapia	6
Terapia biologica	7
Meccanismi di resistenza agli agenti alchilanti.....	9
Regolazione epigenetica nel GBM	11
CAPITOLO 2: Le cellule staminali tumorali	12
Cellule staminali nel sistema nervoso dell' adulto	13
Brain tumor stem cell: origine e pathway molecolari coinvolti nei meccanismi di regolazione delle cellule staminali	15
Origine delle BTSC.....	17
Meccanismi di regolazione delle staminali neurali	17
La zona sottoventricolare	18
CAPITOLO 3: La trasmissione glutammatergica	21
Recettori ionotropici del glutammato	22
Recettori AMPA.....	23
Recettori NMDA.....	24
Recettori del Kainato	25
Recettori metabotropici del gruppo I	25
Recettori metabotropici dei gruppi II e III	38
CAPITOLO 4: Scopo del Lavoro	31
CAPITOLO 5: Materiali e Metodi	33
Farmaci	33
Coltura di cellule staminali tumorali isolate da GBM (GSCs).....	33
Analisi FACS	34
Analisi di PCR.	35
Western blot	37
Trasfezione transiente su cellule staminali tumorali	39
Trasfezione con siRNA	39
Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP).....	40
Real Time-PCR	44
Impianto di cellule CSC GFP+ in topi nudi CD1 e valutazione della crescita tumorale	45
Patient population	47

CAPITOLO 6: Risultati	48
CAPITOLO 7 : Discussione	84
<i>Bibliografia.....</i>	<i>87</i>

Capitolo 1

Il Glioblastoma Multifforme

Le patologie neoplastiche che interessano il sistema nervoso sono una delle principali cause di morte nel mondo.

I tumori del SNC possono essere localizzati a livello intracranico ed extracranico e la sede influenza fortemente le possibilità di resezione chirurgica, di terapia e di cura del paziente.

Uno dei tumori del SNC più comune e più grave è il *glioblastoma multifforme*, classificato dalla WHO come tumore cerebrale di classe IV, che comprende i tumori più aggressivi e con le conseguenze peggiori per il paziente. Le cellule che costituiscono questo tipo di tumore sono caratterizzate, come tutte le cellule tumorali, da un'incontrollata capacità di crescita, da diffusione locale e dalla capacità di formare metastasi. In particolare, le cellule di glioblastoma mostrano un'elevata tendenza ad infiltrare nel parenchima cerebrale e proprio questa capacità è responsabile delle difficoltà nell'approccio chirurgico e dell'alta frequenza di recidive.

Un'ulteriore suddivisione che va rilevata è tra le due forme cliniche di glioblastoma: la forma primaria, caratterizzata da un'insorgenza brusca e da un decorso clinico breve; la forma secondaria, più frequente nell'età giovanile e derivante dall'evoluzione di un preesistente astrocitoma (Kleihues et al. 1999).

Come detto precedentemente il glioblastoma è classificato come neoplasia di grado IV dal WHO. Tale classificazione si basa sul comportamento biologico della massa tumorale. Le neoplasie di classe I sono caratterizzate da scarsa capacità proliferativa e sono curabili tramite asportazione chirurgica. Le neoplasie di classe II hanno, invece, capacità infiltrante nel parenchima cerebrale sano nonostante la scarsa attività proliferativa e mostrano tendenza a formare recidive. La classe III comprende neoplasie fortemente maligne e con intensa attività mitotica. La classe IV, infine, comprende neoplasie con spiccata attività mitotica, tendenza alla necrosi e all'invasività locale e a distanza. Da un punto di vista clinico queste neoplasie evolvono rapidamente sia prima che dopo intervento chirurgico (Louis et al. 2007.)

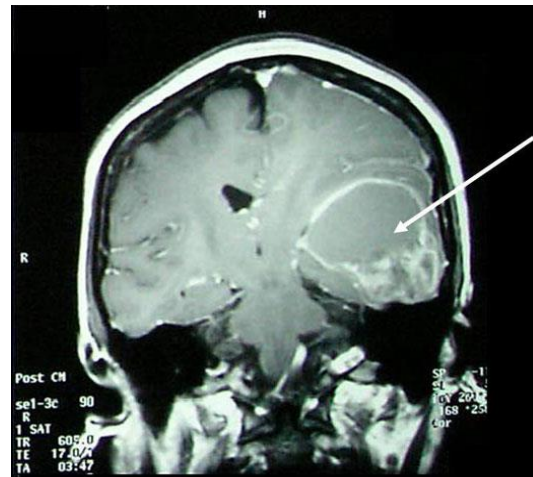
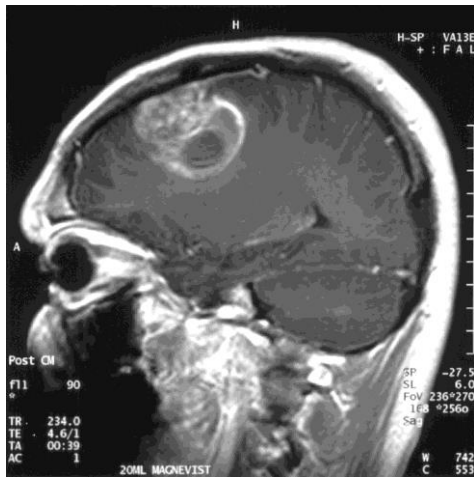


Figura 1: RMN di glioblastoma in sezione sagittale e coronale

Sviluppo del glioblastoma multiforme

La genesi del glioblastoma multiforme è simile, in grandi linee, a quella di molte altre patologie neoplastiche. Alla base sono presenti mutazioni genetiche molteplici che generano popolazioni cellulari caratterizzate dalle seguenti proprietà:

- Autosufficienza dei segnali di crescita
- Insensibilità ai segnali di arresto della crescita
- Evasione dai meccanismi di apoptosi e tendenza alla necrosi
- Incapacità di riparazione dei danni al DNA
- Capacità di formare nuovi vasi (angiogenesi.)
- Invasività e capacità di metastatizzare

Come la maggior parte delle cellule tumorali, anche quelle di glioma sono caratterizzate da una alterazione del ciclo cellulare e da un'anormale ed incontrollata proliferazione. Queste caratteristiche sono riconducibili all'alterazione di alcuni geni che codificano per proteine che svolgono un ruolo di controllo proprio in questi due eventi e che sono definiti *geni oncosoppressori*. Rb e p53, per l'appunto geni oncosoppressori, sono spesso inattivati in molte neoplasie e la loro assenza fa sì che le cellule si dividano in seguito a stimoli mitogeni, come quelli dipendenti dalla PI3K e dalle MAP chinasi, la cui attivazione causa l'induzione della ciclina D1, la sua associazione con le chinasi ciclina dipendenti, CDK4 e CDK6, e la conseguente degradazione di p 27, a sua volta

inibitore della CDK2 (Albanese et al. 1995).

Tutti questi complessi, una volta attivati, portano alla fosforilazione del fattore Rb che si inattiva permettendo l'espressione dei geni target i quali regolano la progressione del ciclo cellulare. Nei gliomi le mutazioni principalmente coinvolte nell'alterazione del ciclo cellulare sono:

- ✓ Mutazione del gene Rb, cromosoma 13q, che risulta mutato nel 25% degli astrocitomi e che determina il passaggio da glioma di basso grado a glioma di grado intermedio
- ✓ Mutazione del gene CDK4, cromosoma 12q, che inattiva Rb nel 15% dei gliomi di alto grado e nel gene CDK6 che viene amplificato (Reifenberg et al. 1994)
- ✓ Mutazione del gene p16, regolatore di CDK4 e CDK6, cromosoma 9p, inattivato tramite perdita allelica o ipermetilazione nel 50-70 % dei gliomi di alto grado e nel 90% delle linee cellulari di glioma (Jen et al. 1994)

Le alterazioni del pathway di Rb, sia negli effettori che negli inibitori, è presente costantemente nei glioblastomi e ciò dimostra l'importanza di questa via nella genesi del tumore (Schmidt et al. 1994).

Tuttavia studi in vitro ed in vivo hanno dimostrato che l'inattivazione della via di Rb, da sola, non è responsabile dell'insorgenza della neoplasia, indicando la presenza di altri importanti pathways che ne complementano l'azione nella genesi del glioma (Holland et al. 1998).

Un altro gene fondamentale per il controllo del ciclo cellulare è p53, presente sul cromosoma 17p. Questo oncosoppressore agisce bloccando il ciclo cellulare in fase G1, in caso di danni al DNA, avviando la cellula o verso l'arresto proliferativo, per dar modo al DNA di essere riparato o verso l'apoptosi, nel caso in cui il danno non possa essere risanato (Vousden et al. 2002). Tra i diversi geni bersagli di p53, il più studiato è CDKN1A, che codifica per la proteina p21, inibitore di CDK2. Mutazioni puntiformi di p53 causano la perdita della sua capacità di legare il DNA e tale alterazione, assieme alla delezione in toto del cromosoma 17p, sono le cause della progressione precoce del glioblastoma secondario (Louis 1994). Un altro oncosoppressore molto importante per la sua interazione con p53 è la proteina p14 che causa la neutralizzazione di MDM2, responsabile dell'ubiquitinazione e della degradazione di p53 (Kamijo et al 1999). La regione cromosomica contenente MDM2, il cromosoma 12q, è amplificata in almeno il 10% dei glioblastomi, la maggior parte dei quali ha p53 non mutato. La mutazione di questo gene è da considerare come un ulteriore meccanismo di inattivazione di questo pathway.

Un'altra caratteristica peculiare delle cellule neoplastiche è la loro capacità di proliferare in maniera indipendente (a diversi livelli) da stimoli proliferativi esogeni che sono per lo più costituiti da molecole di secrezione o dal contatto con componenti della matrice extra cellulare. La possibilità di una crescita più o meno indipendente dalla presenza di segnali esogeni permette a queste cellule di acquisire una maggiore motilità e di evadere dai processi apoptotici. Il meccanismo principale attraverso cui le cellule di glioma superano la normale regolazione del controllo della mitosi riguarda l'attivazione dei recettori tirosin chinasi (RTKs) che può avvenire sia attraverso la sovraespressione dei recettori stessi che dei ligandi recettoriali, creando così un circuito autocrino che si mantiene, in alcuni casi, anche in assenza del ligando.

Nella genesi dei gliomi le vie di trasduzione attivate con maggiore frequenza sono quelle dell'*epidermal growth factor* (EGF) e del *platelet derived growth factor* (PDGF). L'amplificazione del gene che codifica per il recettore dell' EGF è stata riscontrata nel 40% dei glioblastomi ed è spesso accompagnata da un riarrangiamento del gene stesso (Wong et al. 1999), mentre una delezione degli esoni 2-7 del gene è riscontrata nel 20-30% dei glioblastomi. Riarrangiamenti del gene del PDGF-R sono rari ed è la semplice espressione del PDGF e PDGF-R che crea un circuito autocrino e paracrino di stimolazione della crescita (Guo et al. 2003).

Uno dei pathway a valle dei RTKs è Ras, punto in comune con la via di trasduzione delle integrine che, attraverso la fosforilazione delle ERK, promuove la trascrizione dei geni che regolano il ciclo cellulare, come la ciclina D1. L'altra via, attraverso la quale viene trasdotto il segnale mitogeno, è quella della *PI3K* che catalizza la fosforilazione del fosfoinositolo difosfato in fosfoinositolo trifosfato. Uno dei geni che è stato ritrovato mutato in circa il 15% dei glioblastomi è *PIK3CA*, che codifica proprio per la subunità regolativa della chinasi. L'azione della *PI3K* è inibita dall'oncosoppressore *PTEN*, inattivo in circa il 50% dei gliomi tramite mutazione o inattivazione epigenetica, determinando così un'incontrollata attività di segnale da parte della *PI3K* (Knobbe et al. 2004).

L'attività della *PI3K* può essere misurata osservando i livelli di fosforilazione di Akt. Tale proteina può essere fosforilata in due residui chiave ed è implicata nella regolazione del ciclo cellulare, nella proliferazione e nell'apoptosi. Uno degli effetti principali di Akt è l'attivazione di mTOR, classico inibitore della via autofagica (Skeen et al. 2006).

Un'ulteriore caratteristica delle cellule di glioma è la resistenza agli stimoli che inducono la morte cellulare come le radiazioni ionizzanti e i chemioterapici. Questa caratteristica può essere dovuta

ad alterazioni delle vie di signaling, sia a livello delle molecole effettrici e regolatrici implicate nella morte cellulare programmata di tipo estrinseco (mediata da recettori) che di tipo intrinseco (mitocondrio dipendente).

Per quanto riguarda la morte mediata da recettori, i più importanti espressi sulla membrana cellulare sono il TNF-R1, TRAIL.R1, TRAIL-R2, e il CD95 per i quali le cellule di glioma producono un ligando solubile. Tale espressione è correlata al grado di malignità del glioma stesso. (Roth et al. 2001).

Un'altra proteina importante nella regolazione del processo apoptotico è Bcl-2 con azione anti-apoptotica. Essa modula il signaling preservando la membrana mitocondriale e il rilascio del citocromo C, che influenza l'attività caspatica e il processo di morte cellulare programmata. Si ipotizza, inoltre, un ruolo dei membri della famiglia Bcl-2 nei meccanismi di aumentata migrazione e invasività delle cellule tumorali mediante l'alterazione dell'espressione delle metallo proteasi e dei loro inibitori (Wick et al. 1998). Le cellule tumorali di glioma presentano anche una forte tendenza alla necrosi. Essa è dovuta, oltre che all'anossia che coinvolge le cellule interne alla massa tumorale, anche alla proteina Bcl-like 12, che inibendo il processo apoptotico intrinseco, causa una morte necrotica piuttosto che apoptotica (Nicotera et al. 2004). Tale conversione viene operata attraverso il rilascio del citocromo C e conseguente disfunzione mitocondriale. Questi eventi impediscono il mantenimento dell'omeostasi cellulare e provocano la dissoluzione degli organuli intracellulari e della membrana plasmatica. La up-regolazione di Bcl-like 12 è quindi un evento importante nella patogenesi dei gliomi maligni.

Per quanto riguarda la capacità angiogenetica, essa rappresenta uno dei fattori limitanti per la crescita dei tumori solidi (Leon et al. 1996). Il glioblastoma deve, perciò, la sua rapidità di crescita alla capacità di sostenere la massa tumorale attraverso una spiccata angiogenesi.

L'angiogenesi non è soltanto determinata da condizioni di ipossia ma anche da alterazioni genetiche specifiche che stabilizzano HIF-1a o uno dei suoi target a valle come VEGF (Watnick 2003). I nuovi vasi, tuttavia, determinano un apporto ematico spesso insufficiente a causa della loro forma irregolare e tortuosa e con una forte diminuzione, rispetto ai vasi normali, dello scambio gassoso. L'effetto finale che si ottiene è l'ipossia e la conseguente necrosi.

L'ultima caratteristica che vale la pena considerare nel comportamento del glioblastoma è la forte invasività del parenchima cerebrale che rende difficile l'approccio chirurgico e spiega la frequente formazione di recidive. L'invasività è dovuta all'alterazione dei meccanismi di interazione tra le cellule e di queste con la matrice extra-cellulare che devono degradare per potersi muovere

liberamente. La principale differenza con altri tumori è la forte invasività intra-parenchimale a fronte di una capacità metastatica, per via ematica, praticamente nulla poiché le cellule di glioma non sono capaci di oltrepassare la lamina basale dei vasi (Bernstein et al. 1995) e, nel caso riescano a penetrare il compartimento luminale, esse non sono capaci di stabilire una crescita neoplastica stabile all'esterno del SNC. I geni implicati nell'invasività codificano per metalloproteasi (MMP) e per loro inibitori endogeni (TIMPs) e tra quelli codificanti per delle proteasi non MMP vi sono geni delle cistein- proteasi (Uhm et al. 1997) e dell'attivatore del plasminogeno simil-urochinasico (uPA).

Terapia

L'approccio principale per la cura dei pazienti affetti da glioblastoma multiforme è l'asportazione chirurgica, completa o parziale, a seconda della sede di localizzazione del tumore e degli effetti che l'asportazione di parti del cervello potrebbe avere sul paziente.

Oltre all'asportazione chirurgica il paziente può essere sottoposto anche a trattamento con radioterapia adiuvante, anche se il ruolo di questo tipo di terapia è ancora incerto.

Dal punto di vista farmacologico, l'unico trattamento che, ad oggi, ha dato risultati certi, è quello con il farmaco *temozolomide* (Friedman et al. 2000), un agente alchilante del DNA che è in grado di inserire gruppi CH₃ su residui di guanina in posizione N⁷ o O⁶ e su residui di adenina in posizione O³ (Denny et al. 1994). Il farmaco temozolomide si converte spontaneamente in MTIC in soluzione a pH fisiologico (**Fig. 2**). Tale composto è un agente metilante molto reattivo che si converte nel suo catione metildiazonico cedendo il gruppo CH₃ al DNA. Il catione viene poi convertito nel prodotto finale, l' AIC, che viene eliminato dai reni.

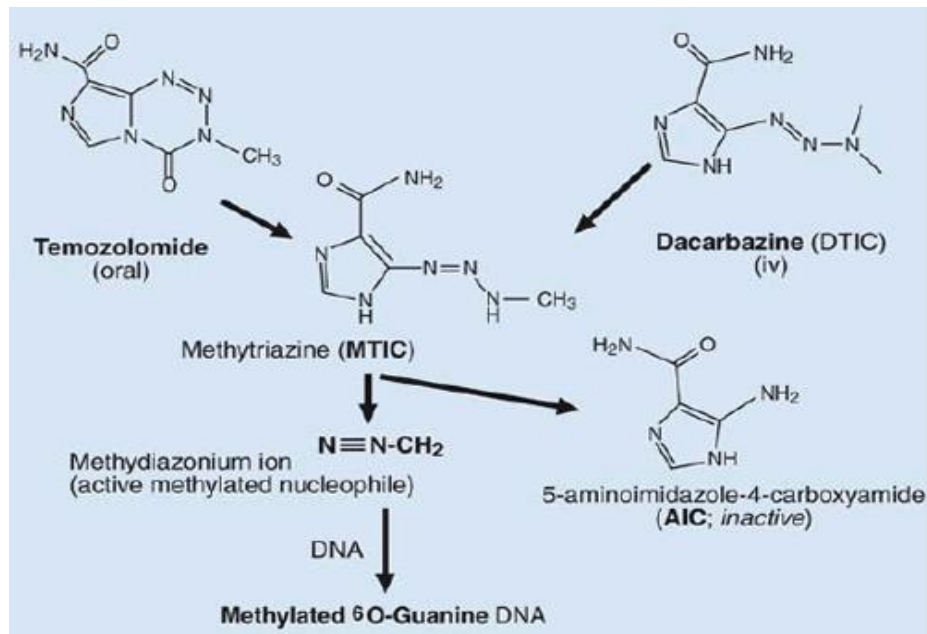


Figura 2: Meccanismo di conversione della temozolomide nel composto attivo (MTIC) e nel composto finale (AIC) che verrà escreto per via renale. (Cancer Control 2008; H. Lee Moffitt)

Gli effetti della temozolomide sono variabili a causa di diversi meccanismi di resistenza presenti nei singoli individui. Altri agenti alchilanti, studiati per il loro effetto sul glioblastoma, come la vincristina, la procarbazine e la lomustina, non hanno dimostrato effetti significativi sulla sopravvivenza. La carmustina è utilizzata in “wafers”, composti con matrice biodegradabile, che vengono impiantati in una cavità formata chirurgicamente dopo la resezione. Anche questo tipo di approccio ha portato a risultati solo marginali.

Terapia biologica

La terapia biologica, la cui applicazione clinica alle neoplasie cerebrali è molto recente, rappresenta un potente strumento nel trattamento di questo tipo di patologie. Grazie allo studio a livello molecolare dei processi che portano all'insorgenza della neoplasia sono stati individuati dei target e degli agenti biologici su cui è possibile intervenire per bloccare la crescita del tumore.

Uno di questi target è il recettore dell' EGF per cui sono stati sintetizzati degli anticorpi monoclonali (cetuximab) e degli inibitori (gefinitib e erlotinib) i quali, legandosi, nel sito di legame per l'agonista (anticorpo monoclonale) o in regioni intracellulari (molecole inibitorie), portano al blocco del signaling dipendente dal recettore stesso influenzando così diversi processi cellulari tra cui la sopravvivenza, la crescita e il ciclo cellulare.

Una seconda categoria di molecole con elevata potenzialità terapeutica sono i composti che legano il VEGF, tra cui il più importante è il *bevacizumab*, già approvato dalla FDA e la *VEGF-trap*.

La VEGF-trap consiste in un composto che lega il VEGF mimando il sito di legame del recettore di membrana (**Fig.3**).

Il principale vantaggio nell'utilizzo delle terapie biologiche è la loro specificità, in quanto esistono dei composti che sono in grado di distinguere tra diverse isoforme recettoriali e agire solo su di esse (Iressa e Tarceva). Tuttavia queste stesse molecole hanno difficoltà ad agire se usate da sole soprattutto a causa delle molteplici sovrapposizioni tra le vie implicate nei processi di crescita cellulare e anche a causa dell'eterogeneità dei tumori stessi.

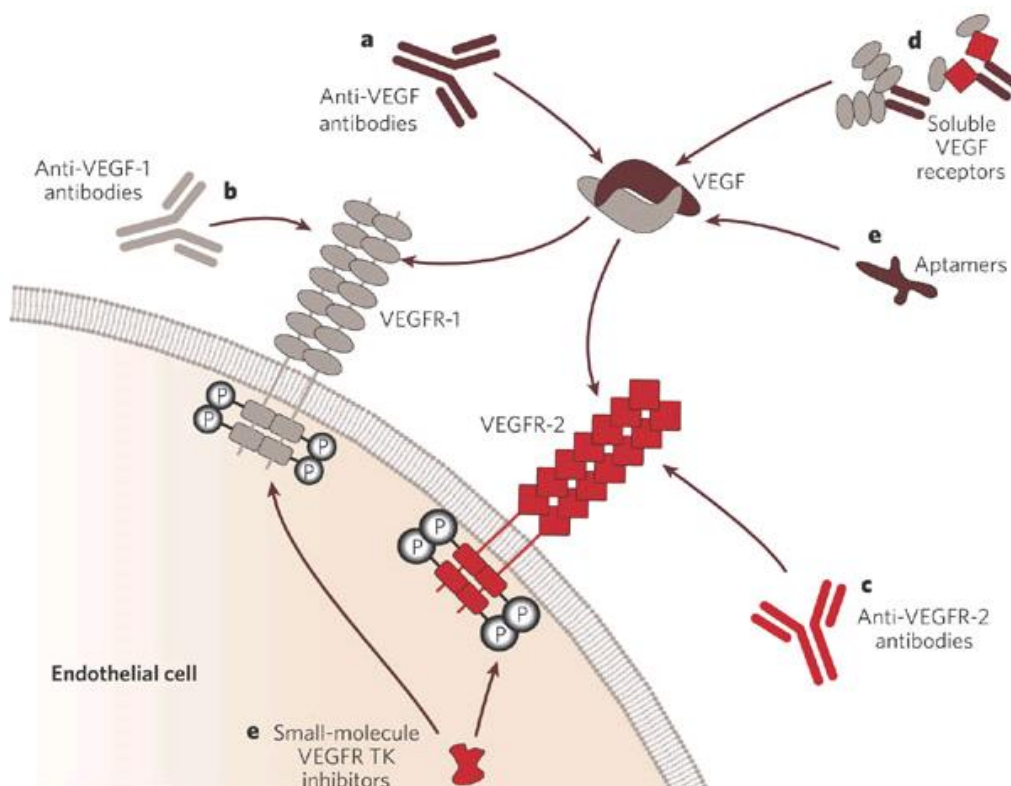


Figura 3 : Esempio di terapia biologica basata sull'inibizione del recettore del VEGF. Come si può osservare sono utilizzati diversi tipi di anticorpi monoclonali che impediscono il legame del VEGF al proprio recettore. In alternativa esistono anche anticorpi il cui sito di legame all'antigene è stato sostituito con il sito di legame del recettore del VEGF. Questo è il meccanismo su cui si basa la VEGF-trap. (Nature 2005; N. Ferrara e R.S.Kerbel)

Meccanismi di resistenza agli agenti alchilanti

E' ormai noto che il glioblastoma multiforme, come molti altri tumori solidi, possiede una presunta componente staminale responsabile della crescita stessa del tumore. Secondo Gentao Liu et al tali cellule, essendo il nucleo germinativo del tumore, presenterebbero una certa resistenza ai chemioterapici, il che spiegherebbe lo scarso effetto del trattamento farmacologico nella cura del tumore.

Per selezionare le cellule con caratteristiche di staminalità si è fatto ricorso al FACS separando le cellule in base all'espressione del marker CD133, una glicoproteina di membrana nota per essere un marker di staminalità. Le cellule selezionate come CD133⁺ sono state poi trattate con diversi chemioterapici dimostrando un'elevata resistenza rispetto alla cellule CD 133⁻.

Le cellule staminali tumorali (BTSC) possono utilizzare diversi meccanismi per espellere il farmaco sfruttando sistemi di trasporto ATP dipendenti (ABC); proteine di membrana che funzionano da "pompe" di efflusso. Tuttavia studi recenti, effettuati mediante metodiche fluorescenti, hanno dimostrato che questo sistema non è il modo principale con cui le cellule di glioblastoma resistono ai chemioterapici (Furnari FB et al 2007).

Il principale meccanismo di resistenza utilizzato dalle cellule di GBM è mediato da un enzima di riparazione del DNA, la O⁶ Metilguanin-DNA- Metiltrasferasi (MGMT) (**Fig.4**). Questo enzima rimuove il gruppo metilico soprannumerario dal residuo di guanina evitando l'ipermetilazione e il conseguente appaiamento errato delle basi durante la replicazione del DNA. Le BTSC (brain tumor stem cell) possono esprimere alti livelli di enzimi riparatori come MGMT che possono così rimuovere i danni indotti da agenti alchilanti come la carmustina e la stessa temozolomide.

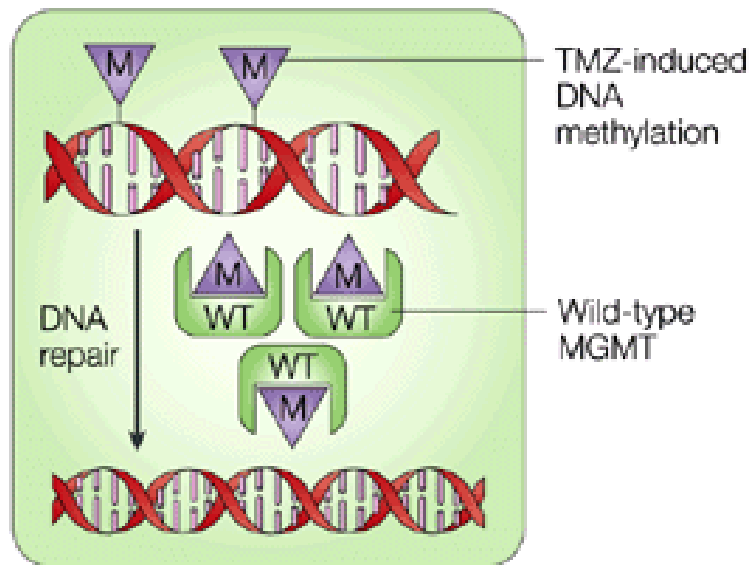


Figura 4 : Meccanismo d' azione dell'enzima MGMT, responsabile della resistenza del tumore all'agente alchilante. Nonostante la temozolomide inserisca gruppi metilici sovrannumerari sui residui di guanina l'enzima interviene rimuovendoli e facendo sì che la cellula evada dal meccanismo di apoptosi che interverrebbe se il danno non fosse riparato (*Nature Reviews Cancer* 2002; B.P. Sorrentino).

L'alchilazione del DNA sull' O⁶ della guanina è un passaggio importante nell'accumulo di mutazioni a causa della tendenza della guanina ipermetilata ad appaiarsi con la timina portando alla transizione delle basi G:C con A:T. Il meccanismo con cui MGMT protegge le cellule dalle lesioni degli agenti alchilanti consiste nel trasferimento del gruppo CH₃ ad una Cys del suo sito attivo. Questo legame determina l'ubiquitinazione e la conseguente degradazione dell'enzima che non può essere riconvertito nella forma attiva. Questo processo è dovuto al forte legame che si viene a creare tra la Cys ed il gruppo metilico che richiede una gran quantità di energia per essere scisso. La quantità di MGMT che una cellula riesce a produrre de novo e quindi i livelli di enzima presenti in essa sono direttamente responsabili della tendenza della cellula a resistere agli agenti alchilanti.

I livelli di MGMT espressa nei diversi tipi di tumori dipendono dalle modifiche epigenetiche del promotore del gene codificante la proteina, tanto è vero che i livelli dell'enzima possono essere ripristinati trattando le cellule con agenti demetilanti (M.Esteller et al. 2000).

Regolazione epigenetica nel GBM

Come appena detto, il promotore della MGMT può essere metilato attraverso un meccanismo di regolazione epigenetica (**Fig. 5**).

Nella regione del promotore del gene esistono due siti di legame per fattori di trascrizione, inclusi SP1, GRE, e AP1 che permettono la trascrizione in presenza dei glucocorticoidi, dell' AMP ciclico e degli attivatori della PKC (protein chinasi C).

Il promotore del gene è situato in una regione ad alta densità nucleosomale in cui si trovano diverse modifiche eterocromatiche e siti altamente metilati che limitano il legame dei fattori di trascrizione. La perdita di espressione della MGMT, che avviene in alcuni tumori e che è legata proprio alla metilazione del promotore, è stata riportata per la prima volta nel 1999, ed è, quindi, clinicamente molto rilevante (Hau P et al 2007). La perdita della MGMT che, per prima cosa, è dovuta ad un aumento dell'incidenza della mutazione puntiforme G-A e in secondo luogo alla mancata espressione dell'enzima, legata alla metilazione del promotore, determina una migliore risposta del tumore ai chemioterapici.

L'ipermetilazione del DNA coinvolge anche i geni di alcune proteine chiave nel processo differenziativo della frazione di *Glioma initiating cells*, come le proteine della famiglia BMP, regolanti il differenziamento astrogliale attraverso la via Jak-STAT. Il silenziamento è inoltre legato all' Histone methyltransferase enhancer 2.

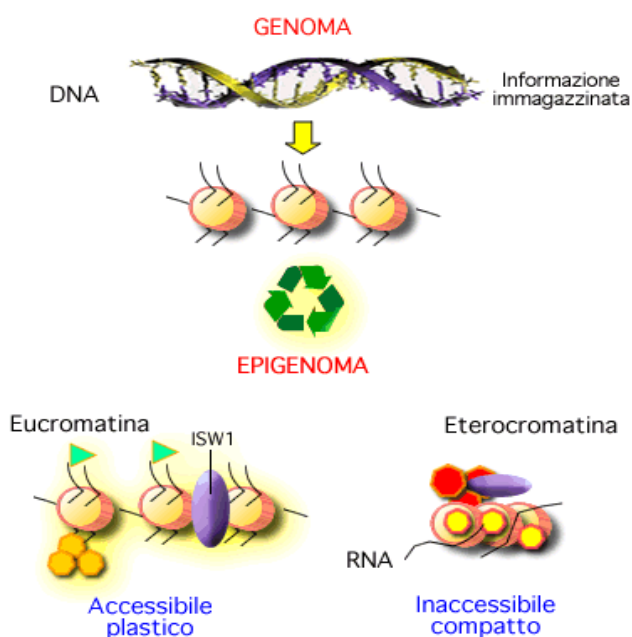


Figura 5: Meccanismi di silenziamento epigenetico.

Capitolo 2

Le cellule staminali tumorali

Con il termine *cellule staminali tumorali* si definiscono cellule che manifestano un comportamento molto simile alle cellule dello stato embrionale, caratterizzate dalla capacità di risposta agli stimoli proliferativi e da un'elevata capacità di proliferazione e di *self-renewal*.

Negli ultimi anni, diversi studi su tumori di varia natura e sul modo in cui essi insorgono, crescono e resistono al trattamento con i chemioterapici, hanno permesso di sviluppare la teoria, ormai sempre più comprovata, che l'origine del tumore sia ascrivibile ad un ristretto gruppo o addirittura ad un'unica cellula trasformata con proprietà staminali e in grado di riprodurre il tumore e sostenerne la crescita in vivo. Questo piccolo gruppo di cellule sono definite "*cellule staminali tumorali*" (Johansson CB et al 1999).

I modelli che sono stati elaborati per spiegare il fenomeno sono due: il **modello stocastico** e il **modello gerarchico**. Secondo il modello stocastico tutte le cellule della massa tumorale avrebbero la stessa capacità tumorigenica che si attiva in modo asincrono e in alcune con una più bassa frequenza (**Fig.6**).

Secondo il modello gerarchico solo un piccolo gruppo di cellule, all'interno della massa tumorale e con un elevato potenziale di crescita, sarebbe in grado di dar origine al tumore e di sostenerne la crescita. Questo secondo modello, in particolare, si accorda molto più del primo con la teoria delle cellule staminali tumorali ed è supportato da notevoli prove sperimentali.

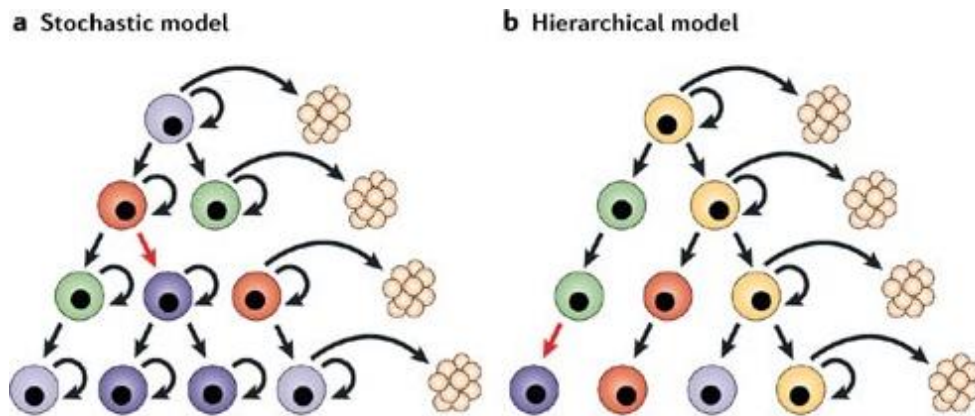


Figura 6 : Rappresentazione del modello stocastico (a) e del modello gerarchico (b). Nella figura a possiamo notare come le cellule siano eterogenee ma tutte in grado di formare la massa tumorale. Nella figura b, invece, notiamo come solo un particolare tipo cellulare sia in grado di formare il tumore (Nature Reviews Cancer 2006; A.L.Vescovi, R.Galli, B. A. Reynolds)

Cellule staminali nel sistema nervoso dell' adulto

La tesi delle cellule staminali tumorali vale anche per i tumori che riguardano il sistema nervoso centrale. Questo tipo di tumori, come ad esempio il glioblastoma multiforme, risultano molto difficili da trattare a causa della loro elevata capacità di infiltrazione nel parenchima cerebrale e i diversi metodi terapeutici a disposizione, compresa la resezione chirurgica, possono danneggiare gravemente i tessuti nervosi del paziente.

Come detto in precedenza, il concetto di cellula staminale tumorale è valido anche per i tumori del sistema nervoso, nonostante per molti anni si fosse ritenuto tale tessuto quiescente e non sottoposto a turnover cellulare. Questa teoria, nota come “no new neuron”, è stata messa in dubbio, per la prima volta, negli anni '60 quando venne descritta la genesi di neuroni nuovi e funzionali nel sistema nervoso adulto. Nonostante la presenza di un tessuto simile a quello embrionale all'interno del parenchima cerebrale, si è continuato a ritenere che la massa tumorale derivasse dalla trasformazione di cellule mature come astrociti e oligodendrociti. (Johansson CB et al 1999)

Nel 1990 Reynolds e Weiss riuscirono ad isolare cellule staminali neuronali dal cervello di un topo adulto.

Questo dimostrò l'esistenza, in regioni ben precise del cervello adulto, di una neogenesi di cellule

mature. Questo processo è fondamentale nella generazione e nell'integrazione di nuovi neuroni nel tessuto neuronale preesistente e per il mantenimento dell'integrità del tessuto cerebrale, della sua plasticità e della sua funzionalità. La conseguenza principale di questo meccanismo è la presenza di cellule staminali mitoticamente attive e di precursori che possono funzionare come sorgenti di cellule trasformate che possono dar luogo a cellule staminali tumorali.

I principali siti, nel cervello, in cui si formano queste cellule sono il **giro dentato** nell'ippocampo e la **zona sottoventricolare (Fig.7)**.

Il compartimento staminale contiene cellule altamente indifferenziate e con un'elevata capacità proliferativa che sono fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi tissutale e che possono dar luogo a tutti i tipi cellulari presenti nel tessuto cerebrale.

Fondamentale è l'elevata capacità di self-renewal che consiste nel mantenere il loro numero costante nel tessuto adulto. Il self-renewal può essere associato anche alla formazione di precursori di uno specifico tipo cellulare grazie ad una divisione asimmetrica che porta alla formazione di una cellula identica alla cellula madre e ad un progenitore maturo. Infine è importante sottolineare che proprio il self-renewal permette di discriminare tra le cellule staminali somatiche e i loro "discendenti" che formano il compartimento delle cellule precursori capaci solamente di riprodurre se stessi in modo limitato (Kirschenbaum B et al 1994).

Le possibili cellule staminali neurali adulte sono state identificate all'interno della zona sottoventricolare ed esprimono la proteina GFAP, principale marker astrogliale. Queste cellule possono ricostruire l'intera struttura neurogenetica attraverso una specifica successione: da queste ipotetiche cellule staminali adulte, chiamate cellule C e che possono essere distinte dagli astrociti maturi del parenchima cerebrale per le loro proprietà staminali, si generano cellule progenitrici "transienti" caratterizzate da un ciclo cellulare di 12 ore. Questi progenitori, chiamate cellule B, sono ancora multipotenti e danno luogo ad un gruppo di progenitori maturi, detti cellule A, da cui si formeranno i neuroni.

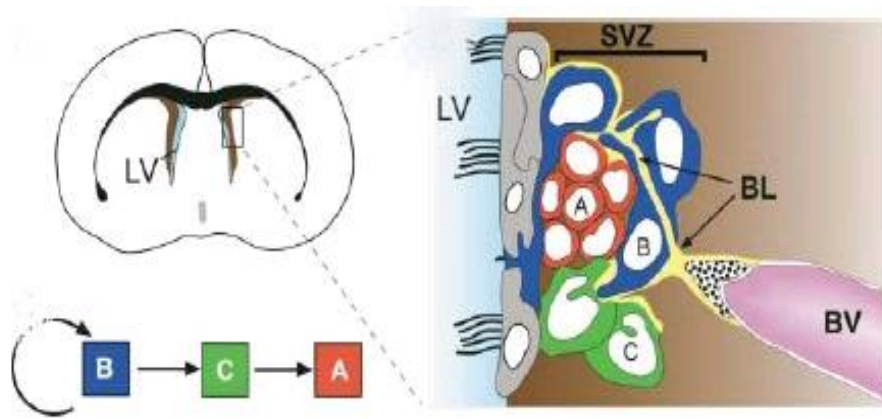


Figura 7: *Organizzazione cellule della zona sottoventricolare. Dalle cellule C, con caratteristiche di staminalità (verde), si formano i precursori non maturi, cellule B, (blu) e da questi i neuroblasti (rosso), precursori dei neuroni, cellule A.* (Neuron. 2004, Alvarez-Buylla and Lim)

Brain tumor stem cell: origine e pathway molecolari coinvolti nei meccanismi di regolazione delle cellule staminali

L'identificazione e l'isolamento delle cellule staminali tumorali cerebrali (BTSC) è un argomento piuttosto controverso a causa dei diversi metodi e criteri con cui queste cellule sono state individuate. Il problema principale era trovare dei marker che ne permettessero l'identificazione e l'arricchimento. Negli ultimi anni uno di questi marker individuati è la proteina di membrana Prominina 1, nota anche come CD133, con cinque domini transmembrana, inizialmente ritenuta presente solo sulle cellule ematopoietiche e scoperta, recentemente, essere anche marker di cellule staminali neurali normali (Reya T. et al 2001).

La prima evidenza sperimentale dell'esistenza di cellule staminali tumorali si deve agli esperimenti di Steindler e colleghi che isolarono, da espianti di glioblastoma umano, precursori che erano in grado di dar luogo a neurosfere, in un mezzo privo di siero, con l'aggiunta di fattori mitogeni e che esprimevano sia markers neuronali che astrogliali, insieme a numerosi determinanti delle cellule staminali. (Fig.8).

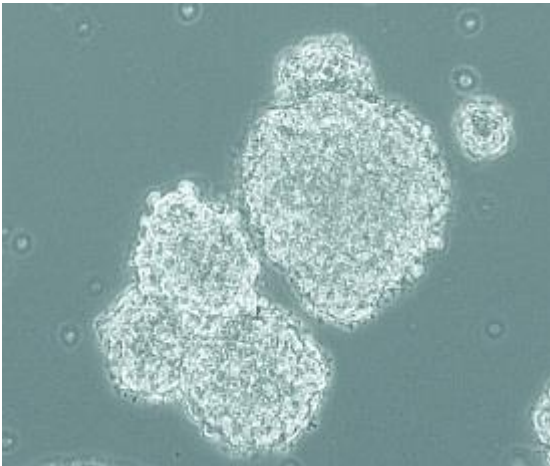


Figura 8 : Le BTSC sono capaci di crescere, *in vitro*, in sospensione, in mezzo privo di siero e in presenza di fattori di crescita EGF ed bFGF, formando aggregati cellulari detti **neurosphere**

L'importanza di queste scoperte risultò fondamentale per diversi motivi:

- ✓ Venne scoperta l'esistenza di precursori mutati e indifferenziati capaci di rispondere ad agenti mitogeni come le cellule staminali neurali adulte;
- ✓ Si osservò che le cellule staminali tumorali possedevano caratteristiche molecolari comuni alle cellule staminali neurali;
- ✓ Si osservò che queste cellule tumorali esprimevano una proteina di membrana, il CD133, marker di cellule staminali neurali normali.

Proprio il CD133 viene utilizzato per isolare ed arricchire la popolazione di cellule staminali tumorali con capacità, anche *in vitro*, di self-renewal, multipotenza e in grado di generare una numerosa progenie. Inoltre queste cellule, quando trapiantate *in vivo* in topi immunodeficienti, sono capaci di ripristinare un nuovo tumore con le stesse caratteristiche di quello da cui tali cellule sono state ottenute. Questa caratteristica è propria solo delle cellule CD133⁺, mentre la popolazione di CD133⁻ mostra di non avere alcuna capacità tumorigenica (Liu G et al 2006).

Le cellule CD133⁺, rispetto alla loro controparte negativa, hanno diverse altre caratteristiche: innanzitutto esse sono in grado di crescere in sospensione continuando a proliferare e a formare sfere (Sheila K. Et al 2003); una seconda caratteristica delle CD133⁺ è la capacità di resistere ai chemioterapici grazie a diversi sistemi di espulsione del farmaco (sistemi di trasporto ABC) e un'elevata capacità di riparare i danni al DNA e resistenza all'apoptosi.

In un lavoro del 2006 Gentao liu et al. analizzarono i profili di espressione di alcuni geni sia nelle cellule CD133⁺ che nelle CD133⁻. Un primo risultato interessante riguardava proprio la chemioresistenza: mentre le CD133⁺ esprimevano alti livelli di BCRP1 e di MGMT, proteine

coinvolte nella chemioresistenza ed espresse nelle cellule staminali normali, le CD133⁻ esprimevano gli stessi enzimi rispettivamente 6 volte e 32 volte di meno. Questa differenza si notò anche per altre proteine come le IAP, coinvolte nel blocco dell'apoptosi.

Origine delle BTSC

Numerose prove sperimentali indicano, ormai, che i tumori del sistema nervoso derivano dalla trasformazione di cellule precursori indifferenziate che sono state scoperte anche in particolari zone del cervello dell'adulto. E' stato suggerito che, affinché una cellula neurale normale assuma un fenotipo tumorale, si devono verificare tra le 4 e le 7 mutazioni indipendenti, alcune delle quali vengono acquisite ad uno stadio molto precoce, predisponendo le cellule a diventare tumorali. Tali mutazioni sono ,però, eventi stocastici che si accumulano in un arco di tempo piuttosto lungo. I progenitori "transienti" , che derivano direttamente dalle cellule staminali, hanno un tempo di vita piuttosto breve, nel senso che differenziano in poco tempo e queste cellule differenziate sono per lo più quiescenti e in caso di danno possono andare incontro ad apoptosi. (Vescovi AL et al 2006). Per queste loro caratteristiche, le mutazioni non possono accumularsi nelle cellule allo stadio di progenitori né di cellule terminalmente differenziate, mentre invece dei target preferenziali per questo tipo di mutazione sono proprio le cellule staminali somatiche. Tuttavia i progenitori transienti derivano dalle staminali somatiche e perciò ne ereditano le mutazioni a cui se ne possono aggiungere altre causate dalla loro rapida divisione e che portano infine le cellule verso un fenotipo sempre più tumorale (Rietze RL et al 2006).

Il ruolo dei progenitori transienti, cellule B, come possibile fonte di cellule staminali tumorali è supportato dalla scoperta che tali cellule esprimono una forma alterata, almeno nel 50% dei gliomi umani, costitutivamente attiva del recettore EGF che controlla diversi pathways tra cui quello relativo alla proliferazione e alla crescita cellulare.

Meccanismi di regolazione delle staminali neurali

Nelle cellule precursori mutate, da cui deriveranno le cellule tumorali, sono presenti dei pathways comuni alle cellule neurali normali che però subiscono diverse alterazioni. Uno di essi riguarda proprio l' EGF-R, la cui espressione è up-regolata durante la formazione del tumore ed è implicata nella malignità del tumore stesso e nella risposta ai farmaci. Allo stesso modo anche il FGF-R, che regola la proliferazione delle cellule staminali neurali, è stato proposto come un fattore autocrino

coinvolto nella proliferazione e nell'angiogenesi.

Una seconda via che subisce alterazione è quella di Notch e dei suoi ligandi, Delta-like 1 e Jagged 1, correlati anche loro con la proliferazione e aventi un effetto positivo sul self-renewal nelle cellule staminali neurali dell'adulto.

Nel glioma troviamo anche l'alterazione della via di Sonic Hedgehog e dei suoi effettori, i fattori di trascrizione Gli1, Gli2 e Gli3. Tali fattori, attivati da Sonic Hedgehog, regolano il self-renewal e controllano la proliferazione dei precursori nella zona sottoventricolare dell'adulto.

Infine altri geni alterati nei tumori del sistema nervoso sono PTEN e il pathway Wnt- β catenina.

PTEN è un oncosoppressore con un ruolo fondamentale nel controllo della proliferazione delle cellule staminali neurali e dei precursori, sia in vitro che in vivo e controlla la migrazione nella zona sottoventricolare. La via di Wnt- β catenina è anch'essa implicata nella neurogenesi anche se questa correlazione è stata maggiormente evidenziata nel medulloblastoma piuttosto che nel glioma. Tuttavia l'interferenza nella via di Wnt, attraverso l'uso di modulatori come Frizzled, promuove la crescita di gliomi inibendone però la capacità invasiva. (Tunici P et al 2004).

La zona sottoventricolare.

Le cellule staminali neurali, provengono da due regioni specifiche del cervello adulto: il giro dentato dell'ippocampo e la zona sottoventricolare del prosencefalo. Quest'ultima rappresenta un residuo degli strati germinativi embrionali e costituisce una vera e propria “**nicchia staminale**” nel cervello adulto.

Per “nicchia staminale” si intende una regione, all'interno del tessuto adulto, in cui sono presenti segnali extra cellulari che creano il microambiente adatto al mantenimento delle cellule in uno stato multipotente, il cui meccanismo di crescita e di espansione resta controllato (Morshead CM et al 1994).

La zona sottoventricolare è caratterizzata dalla presenza di quattro strati cellulari che differiscono per spessore, densità e composizione cellulare (**Fig 9**):

Layer I → è lo strato più interno e contiene un solo strato di cellule **ependimali** che delimitano la cavità ventricolare. Queste cellule possiedono microvilli apicali e numerose estensioni che possono estendersi in senso parallelo o perpendicolare alla superficie del ventricolo. Attraverso queste estensioni le cellule ependimali si collegano agli astrociti presenti nel Layer II.

Layer II → contiene processi astrocitari caratterizzati dall'espressione della GFAP (proteina acida fibrillare gliale). Tali processi astrocitari sono legati a complessi giunzionali e mancano di corpi cellulari, tranne per la presenza di qualche corpo neuronale. Anche se nell'uomo la funzione delle

cellule di questo secondo strato non è ancora nota, si ipotizza che i collegamenti astrocitari e le cellule ependimali del Layer I possano interconnettersi e regolare le funzioni neuronali, l'omeostasi metabolica e controllare la proliferazione e il differenziamento durante lo sviluppo.

Layer III → forma una sorta di “fascia di astrociti” che, si ritiene, mantengano caratteristiche di multipotenza e la capacità, in vitro, di formare neurosfere (Sanai N et al 2004). Gli astrociti del Layer III possono essere divisi in tre popolazioni: la prima è caratterizzata da astrociti piccoli con proiezioni orizzontali e tangenziali rispetto alle cellule del Layer II; la seconda popolazione si colloca tra il Layer II e il III e all'interno della "fascia di astrociti" ed è caratterizzata da diversi organelli di grandi dimensioni; la terza popolazione è posizionata nel ventricolo laterale, appena sopra l'ippocampo, con dimensioni simili alle cellule della seconda popolazione ma con meno organelli.

Layer IV → costituisce una zona di transizione tra il Layer III e il parenchima cerebrale ed è caratterizzato da un'alta presenza di mielina (Buylla et al 2006).

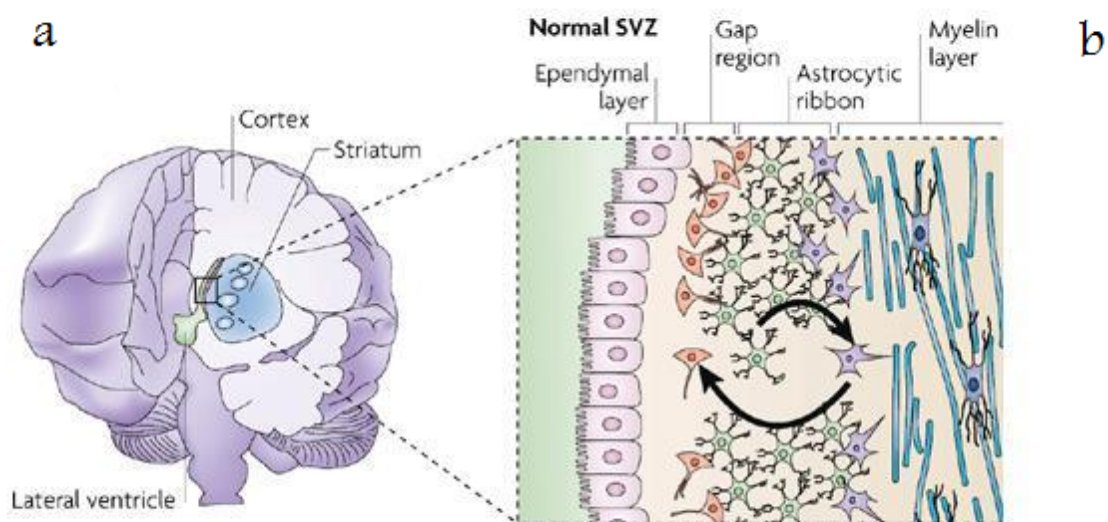


Figura 9 : Struttura della zona sottoventricolare. Si può osservare, nella figura a, la posizione della SVZ (zona sottoventricolare); nella figura b, invece, sono riportati i quattro strati cellulari che costituiscono la regione SVZ. (Nature Reviews Cancer 2007; M.A.Curtis R.L.M.Faull,P.S.Eriksson)

Nella SVZ dei roditori gli astrociti hanno un duplice ruolo ovvero, agiscono da cellule staminali neurali e supportano la neurogenesi attraverso l'interazione con altre cellule. Questa seconda funzione è modulata dalla microglia e dalle cellule endoteliali che interagiscono cooperativamente con le cellule staminali neurali per promuovere la neurogenesi in vitro così come i componenti della matrice extracellulare, tra cui la tenescina C e il fattore Lewis X che interagisce con i precursori neurali.

La SVZ umana è differente da quella dei roditori per due caratteristiche specifiche: la prima è che le cellule ependimali del Layer I non sono giustapposte agli astrociti del Layer II ma sono separate da uno strato privo di corpi cellulari; la seconda è che nella SVZ umana mancano i neuroblasti che migrano verso il bulbo olfattivo e ciò determina una minore quantità di cellule nell'uomo rispetto al roditore, la cui SVZ fornisce molte più informazioni relative alla relazione tra struttura e funzione rispetto al modello umano.

Capitolo 3

La trasmissione glutammatergica

Il glutammato è uno dei principali neurotrasmettitori del SNC, presente nel 50 % dei tessuti nervosi ed interagisce con due tipi di recettori, i **recettori metabotropici** e i **recettori ionotropici**.

I recettori ionotropici (iGlu) permettono, interagendo con il ligando, un flusso eccitatorio di ioni che permettono una trasmissione rapida del segnale.

I recettori metabotropici, invece, sono accoppiati a proteine G e modulano il segnale attraverso l'attivazione di diverse proteine effettrici a valle del recettore.

La trasmissione glutammatergica svolge un ruolo importante nei processi patologici e fisiologici del SNC, tra cui la trasmissione eccitatoria rapida, la plasticità sinaptica, i meccanismi di apprendimento e di memoria e fenomeni neurotossici.

Diversi circuiti neuronali si avvalgono di sinapsi glutammatergiche, circuiti che sono implicati in eventi fisiologici di sinaptogenesi, sopravvivenza neuronale, meccanismi di riparazione dopo lesioni e fenomeni di plasticità sinaptica nell'adulto.

Recenti evidenze sperimentali hanno messo in luce il ruolo del glutammato e dei suoi recettori nello sviluppo del SNC: diversi sottotipi recettoriali risultano espressi nel cervello di ratto a diversi stadi di sviluppo. Il sottotipo 5 dei recettori metabotropici del glutammato sono principalmente espressi nelle aree che circondano i ventricoli laterali al 15° giorno di vita embrionale mentre, dopo la nascita, tali recettori risultano espressi, oltre che sui neuroni e sugli astrociti, dove si trovano tradizionalmente, anche in zone di neurogenesi attiva come il giro dentato dell'ippocampo e la SVZ. (Di Giorgi Gerevini et al 2004).

Recettori ionotropici del glutammato.

In modo simile ai recettori ionotropici di altri neurotrasmettitori, anche quelli del glutammato sono costituiti da diverse subunità che attraversano la membrana plasmatica e che formano un canale attraverso cui gli ioni possono muoversi verso la regione citoplasmatica o in direzione opposta.

Nel caso dei recettori ionotropici glutammatergici si ritiene che il canale sia costituito da 5 subunità e che la diversa combinazione di esse determini le proprietà peculiari di ciascun tipo di recettore. Dal punto di vista strutturale i recettori del glutammato sono caratterizzati dalla presenza di 4 domini trans membrana, con un dominio N-terminale extracellulare e un dominio C terminale, indicato come extracellulare. In realtà, recenti studi, hanno ipotizzato che la regione C terminale sia intracellulare (Molnàr et al. 1993) e sono stati elaborati diversi possibili modelli, dei quali il più accreditato prevede che il secondo dominio transmembrana non sia un'elica ma che formi un ripiegamento verso il citoplasma (**Fig.10**).

I più importanti recettori ionotropici del glutammato sono: **AMPA** , **NMDA** e il **recettore del Kainato**.

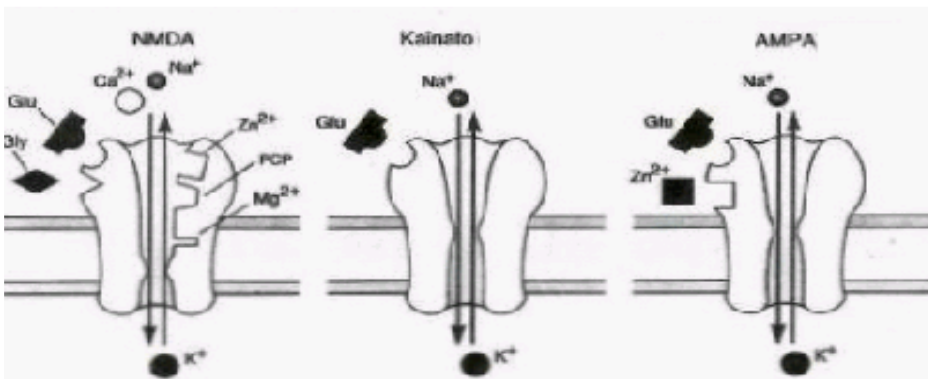


Figura 10: La figura mostra i tre più importanti recettori ionotropici del glutammato e il relativo flusso di ioni che è attivato dal legame con il ligando.

Recettore AMPA

L'AMPA (alfa-Amino-3-Idrossi-5-Metil-4-isoxazolone propionato) è una molecola agonista del glutammato. I recettori AMPA si trovano nella maggior parte delle sinapsi eccitatorie e coesistono con i recettori NMDA. Gli AMPA sono caratterizzati da una rapida attivazione e inattivazione e da una bassa permeabilità ai cationi bivalenti.

I recettori AMPA sono costituiti da 4 subunità, GluR-A/ GluR-D (Hollmann and Heinemann,1994), costituite da 850-950 aminoacidi ed omologhe per il 70%. Diversi studi, condotti su recettori ricombinanti, hanno dimostrato che le caratteristiche dei recettori AMPA dipendono dalle singole subunità che li compongono e che ne determinano la permeabilità al Ca^{2+} , la desensibilizzazione e l'inattivazione (Hollmann et al.1991; Burnashev et al. 1992; Masbacher et al 1994). Proprio a dimostrazione di questo i recettori AMPA costituiti dalla subunità GluR-B hanno una bassa permeabilità al Ca^{2+} rispetto a quelli che non posseggono tale subunità.

La permeabilità al Ca^{2+} è modulata dalla presenza di un residuo di Arg nella seconda regione transmembrana proprio del dominio GluR-B mentre, nelle altre subunità, la stessa posizione è occupata da una glutammina (Q) (Hume et al 1991). La sostituzione tra Q e R si realizza non tanto a livello genico, quanto a livello di mRNA durante il processo di editing (Higuchi et al 1993). La forma non modificata è presente solo nello 0.01%, indicando che la maggior parte degli AMPA non sono permeabili al Ca^{2+} .

Recettori NMDA

I recettori NMDA differiscono dagli altri recettori ionotropici del glutammato in quanto, in condizioni di riposo della membrana post sinaptica, il legame dell'agonista o del glutammato non è in grado di attivare il recettore. Il recettore infatti, in condizioni fisiologiche, è bloccato da uno ione Mg^{2+} che risiede all'interno del canale. Quando la membrana post-sinaptica viene depolarizzata, il blocco determinato dalla presenza di questo ione viene rimosso permettendo il flusso ionico attraverso il canale. Per far sì che il canale si attivi è, perciò, necessario, sia il rilascio del glutammato dalla membrana pre-sinaptica, sia la depolarizzazione della membrana post-sinaptica. Sono perciò recettori attivati sia dalla presenza del ligando, sia dalla variazione del voltaggio della membrana.

Un altro elemento importante che riguarda il recettore è il legame di una Gly che potenzia l'interazione con il glutammato, permettendo il passaggio della corrente ionica. La Gly può essere considerata un co-trasmittitore di tale recettore (Thomson et al 1989).

Il canale NMDA è molto più permeabile dell' AMPA nei confronti del Ca^{2+} ma anche al Na^+ e al K^+ . (Fig.11).

Questi recettori sono coinvolti nell'incremento dell'efficacia sinaptica in regioni specifiche, processo chiamato “**Long Term Potentiation**”, che è alla base della plasticità sinaptica a lungo termine, come apprendimento e memoria (Bliss and Collingridge, 1993). Un' eccessiva attivazione del recettore porta invece a morte neurale (Choi 1988).

Infine, dal punto di vista strutturale, i recettori NMDA sono costituiti dall'assemblaggio di due tipi di subunità: NMDA-R1, espressa in tutti i recettori NMDA e 4 NMDAR-2 , codificate da diversi geni ed espresse selettivamente in alcune aree cerebrali.

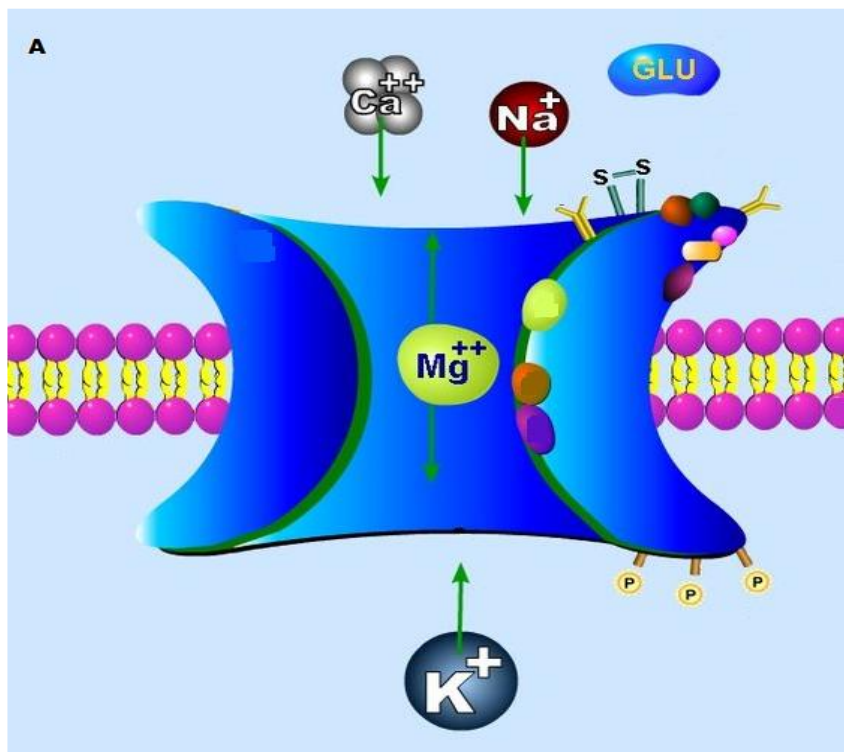


Figura 11: La figura mostra la struttura del recettore ionotropico del glutammato NMDA. Si può notare la presenza dello ione Mg^{2+} e il flusso di ioni che, in assenza di esso, sono in grado di attraversare il canale. Per l'attivazione del canale, oltre alla presenza del glutammato, è necessaria la depolarizzazione della membrana post-sinaptica e il legame della Gly che si può considerare un co-attivatore del recettore.

Recettori del Kainato

L'acido kainico è una potente neurotossina con proprietà di agonista per alcuni sottotipi recettoriali del glutammato. Il kainato può attivare due tipi di correnti: una non desensitizzante, se lega i recettori AMPA e una desensitizzante rapida, quando interagisce con una sottofamiglia di recettori ad alta affinità (KA1, KA2, GluR -5, -6, -7).

I recettori ad alta affinità per il kainato presentano una limitata omologia di sequenza con gli altri recettori per il glutammato e risultano 50 volte meno abbondanti rispetto ai recettori AMPA. L'espressione di questi recettori in tutte le regioni cerebrali suggerisce che i recettori per il kainato potrebbero essere coinvolti in tutti i circuiti glutamatergici. Le subunità KA-1 e KA-2, se espresse in presenza dei GluR -5 e GluR -6, possono impartire proprietà elettrofisiologiche diverse rispetto ai recettori costituiti da subunità omomeriche (Herb et al 1992). Infine anche queste subunità sono sottoposte al processo di RNA editing nel sito Q/R.

Recettori metabotropici del gruppo I

La stimolazione di cellule nervose di vari preparati con agonisti glutamatergici produce un rilevante aumento dell'idrolisi dei polifosfoinositidi di membrana (PPI). L'interazione dell'agonista con i recettori di membrana del Gruppo I comporta l'attivazione della fosfolipasi C, enzima che catalizza la scissione del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP₂) con liberazione di inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e di diacilglicerolo (DAG). Entrambi gli elementi possiedono un ruolo di secondo messaggero e promuovono la cascata degli eventi lungo due diversi percorsi: l'IP₃ agisce sui calciosomi, porzioni specializzate del reticolo endoplasmatico liscio, mobilizzando i depositi di Ca²⁺ e aumentando le concentrazioni citosoliche dello ione; il DAG agisce in concerto con la fosfatidilserina e il Ca²⁺ per attivare la proteina chinasi C.

Esistono profonde differenze tra i recettori mGlu1 e mGlu5: mGlu1-a è sensibile alla tossina della pertosse, perciò è accoppiato ad una proteina G del tipo G₀ o G_i, invece, mGlu5 è insensibile alla tossina della pertosse quindi interagisce con la proteina G_q (Pickering ed al., 1993). Inoltre, il recettore mGlu5, in cellule HEK293 o in cellule CHO, opera un rilascio dello ione Ca²⁺ mediante una cinetica di tipo oscillatorio, mentre il recettore mGlu1-a produce una risposta a "single-peak". Mediante il coinvolgimento di proteine GTP-dipendenti, i recettori mGlu1 (più precisamente gli 1-a) possono altresì accoppiarsi a canali ionici permeabili allo ione K⁺, tra cui i canali Ca²⁺-dipendenti AHP outward-rectifiers, che sono responsabili dell'iperpolarizzazione postuma e del fenomeno

dell'accomodazione del potenziale d'azione (Pickering ed al., 1993) (**Fig.12**). Elevati livelli di mRNA di mGluR1 sono stati riscontrati in molte aree del SNC, incluso il cervelletto, l'ippocampo, il bulbo olfattivo e il talamo. Tecniche immunocitochimiche hanno evidenziato la presenza dei recettori mGlu1-a nei corpi e nei dendriti delle cellule del Purkinje. Un'elevata espressione di recettori mGlu5 è stata localizzata nello striato, minori quantità si trovano, invece, nel cervelletto e nella regione ponto-midollare. (Baskys, 1994). Sembra che, diversamente dai recettori ionotropici, gli mGlu del gruppo I siano localizzati a livello della membrana post-sinaptica e, perciò, attivabili solo dagli elevati livelli di glutammato caratteristici delle condizioni di iperattività. È generalmente accettata l'importanza dei recettori del gruppo I nell'aumentare l'eccitazione neurale e l'eccitabilità (Nicoletti et al., 1996).

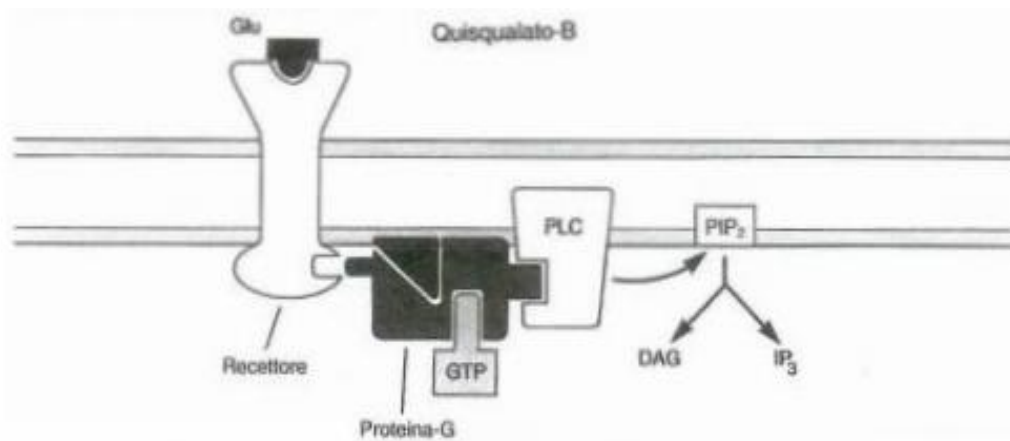


Figura 12: Nella figura viene riportato il meccanismo molecolare a valle del recettore metabotropico di classe I con l'attivazione della PLC e la formazione dei due effettori DAG e dell' IP₃.

Agonisti non selettivi del gruppo I

L'acido quisqualico (Quis) rappresenta in assoluto la prima molecola individuata come agonista dei recettori mGlu associati all'idrolisi dei polifosfoinositidi. Mostra un'elevata potenza e selettività di legame, sia verso i recettori nativi sia verso i ricombinanti. Il suo impiego è limitato dall'attività di agonista sui recettori AMPA.

Agonisti selettivi dei recettori metabotropici del gruppo I

La 3,5-diidrossifenilglicina (3,5-DHPG) è il primo agonista selettivo per i recettori del gruppo I ad essere stato sintetizzato e non ha attività sui recettori del II o III gruppo. La sostituzione dell'acido

carbossilico della 3,5-DHPG con un acido fosfinico produce l'acido 3,5-diidrossifenilmetilfosfinico (DHPMP), che agisce come agonista potente e selettivo nei confronti dei recettori mGlu1 e -5. L'attività della 3,5-DHPG è mantenuta, anche se con minore efficacia e potenza, nell'analogo monofenolico 3-idrossifenilglicina (CHPG), un composto meno potente, ma dotato di un'elevata selettività nei confronti dei recettori mGlu5.

Antagonisti selettivi dei recettori metabotropici del gruppo I

Recente è la sintesi di molecole analoghe alla carbossifenilglicina (4-CPG), come l'MCPG (□-metil-4-carbossifenilglicina) e la 4-C-3-HPG (4-carbossi-3-idrossifenilglicina), che sono antagonisti competitivi dei recettori mGlu1 e, con minore affinità, dei recettori mGlu5. Questi composti sono, tuttavia, in grado di interagire con i recettori metabotropici del secondo gruppo (mGlu2 e -3). Ad esempio, la 4C3HPG agisce da agonista, mentre l'MCPG come antagonista dei recettori mGlu2 e -3. Allo scopo di migliorare la selettività dei derivati della fenilglicina nei confronti dei sottotipi recettoriali del primo gruppo, sono state realizzate opportune sostituzioni sulla struttura della 4CPG: il risultato è un analogo metilico, LY367385 (2-metil-4-carbossifenilglicina), che si comporta come un antagonista selettivo dei recettori mGlu1 e non interagisce con i recettori del gruppo II.

Antagonisti selettivi non competitivi dei recettori metabotropici del gruppo I

Tra gli antagonisti che agiscono mediante meccanismo non competitivo, l'estere etilico dell'acido 7-(idrossiimino)ciclopropan[b]cromen-1a-carbossilico (CPCCOEt) esibisce elevata potenza e selettività nei confronti dei recettori mGlu1. Il sito di legame del CPCCOEt coinvolge due amminoacidi (treonina 815 ed alanina 818), localizzati nella superficie extracellulare del settimo dominio transmembrana, e non la porzione ammino-terminale del recettore.

Recentemente sono stati sintetizzati alcuni derivati fenilpiridinici che esibiscono un'elevata potenza e selettività come antagonisti non-competitivi dei recettori mGlu5. Tra questi, i composti 2-metil-6-feniletinilpiridina (MPEP), 6-metil-2-fenilazopiridin-3-olo (SIB-1757) e 2-metil-6-stiril-piridina (SIB-1893) sono attualmente utilizzati per studiare gli effetti dell'attivazione endogena dei recettori mGlu5 (Schoepp et al., 1999).

Recettori metabotropici dei gruppi II e III

In cellule CHO e BHK ricombinanti i recettori metabotropici del secondo gruppo (mGlu2 e -3) sono accoppiati alla proteina G_i , sensibile alla tossina della pertosse, che media la trasduzione del segnale inibendo l'adenilato ciclasi. I recettori mGlu2 sono anche accoppiati negativamente a canali per il Ca^{2+} voltaggio-dipendenti (canali VOC di tipo L, N, P o Q) (Tanabe ed al., 1992). Si ritiene che i recettori metabotropici del gruppo II e III modulino la neurotossicità da amminoacidi eccitatori attraverso un meccanismo di inibizione pre-sinaptica (Nicoletti et al. 1996; Flor ed al., 1998) (Fig.13).

Agonisti recettoriali

I recettori mGlu2 e -3 esibiscono un simile profilo farmacologico in virtù della loro elevata omologia strutturale. La farmacologia dei recettori del gruppo III (recettori mGlu4, -6, -7 ed -8) è stata solo parzialmente caratterizzata. Due analoghi del glutammato, l'acido L-2-amino-4-phosphonobutanoico (L-AP4) e la L-serina-O-fosfato (L-SOP), riducono il rilascio di acido glutammico dai terminali attraverso un meccanismo presinaptico. E' oggi noto che tale effetto è mediato dai sottotipi mGluR4, -7 ed -8.

Agonisti non selettivi dei recettori metabotropici del gruppo II

L'1S,3R-ACPD è in grado di attivare i recettori mGlu2 e -3 ma, come già riportato in precedenza, esso è anche in grado di attivare i sottotipi del primo gruppo. Tale composto si comporta anche come substrato della glutammina sintetasi, l'enzima astrocitario che converte il glutammato in glutammina. Altri agonisti dei recettori del secondo gruppo sono l'acido ibotenico ed una serie di derivati fenilglicinici, quali la 4CPG, la 4C3HPG, la 3H4CPG e la 3HPG.

Agonisti selettivi dei recettori metabotropici del gruppo II

Alcuni composti, sintetizzati di recente, hanno mostrato una più elevata selettività e potenza nei confronti dei recettori metabotropici del gruppo II. La sostituzione del gruppo metilenico in posizione C4 di ACPD con una funzione aminica ha prodotto il composto 2R,4R-4-aminopirrolin-2,4-dicarbossilico (2R,4R-APDC). Tale composto, dotato di affinità nanomolare nei confronti dei recettori mGlu2 e -3, è oggi considerato l'agonista più selettivo dei recettori metabotropici del

secondo gruppo. Alcuni composti biciclici sintetizzati dai laboratori della Eli Lilly (LY354740, LY379268 ed LY389795) sono tra i più potenti agonisti dei recettori metabotropici mGlu2 e -3. Tali composti sono biodisponibili per via orale e, dunque, offrono notevoli vantaggi nello studio dei recettori metabotropici in modelli in vivo. Il composto LY354740 è attualmente sottoposto a trials clinici come farmaco ansiolitico.

Agonisti dei recettori metabotropici del gruppo III

Il più potente agonista dei recettori del gruppo III (con elevata affinità nei confronti dei recettori mGlu4, -6 ed -8) è l'L-AP4, derivato dall'acido glutammico per sostituzione isosterica del gruppo carbossilico con l'acido fosfonico. La L-serina-O-fosfato è un composto endogeno, prodotto dall'idrolisi della fosfatidilserina, che si accumula nel parenchima cerebrale di soggetti affetti da malattia di Alzheimer. Tale composto agisce da agonista pieno nei confronti dei recettori del gruppo III e, in particolare, nei confronti dei recettori mGlu4, -6 ed -8 con potenza simile a quella del glutammato. Sia l'L-AP4 che la L-SOP, tuttavia, fungono da substrati nei confronti del trasportatore Ca^{2+}/Cl^{-} -dipendente del glutammato.

Antagonisti dei recettori metabotropici dei gruppi II e III

Uno dei primi composti identificati come antagonisti per i recettori del gruppo II è l'MCPG, la cui azione non è però selettiva. Tale composto antagonizza, infatti, anche sottotipi dei recettori del primo e terzo gruppo (il composto non interagisce però con i recettori mGlu4, -6 e -7). Un analogo di DHPG con un ulteriore gruppo idrossilico legato al fenile in posizione 4, l'(R,S) -3,4,5-triidrossifenilglicina (THPG), è capace di antagonizzare l'azione dell'L-AP4 nelle cellule bipolari ON della retina, suggerendo l'interazione con i recettori mGlu6. Il DCG-IV, agonista dei recettori del secondo gruppo, si comporta anche come debole antagonista dei sottotipi del gruppo III e del gruppo I; ciò ne ha limitato l'impiego in studi farmacologici. (Schoepp ed al., 1999)

E' evidente, in ogni modo, la necessità di orientare la ricerca verso il disegno di antagonisti (competitivi e non competitivi) ad elevata potenza e specificità d'azione per i sottotipi recettoriali del II e del III gruppo.

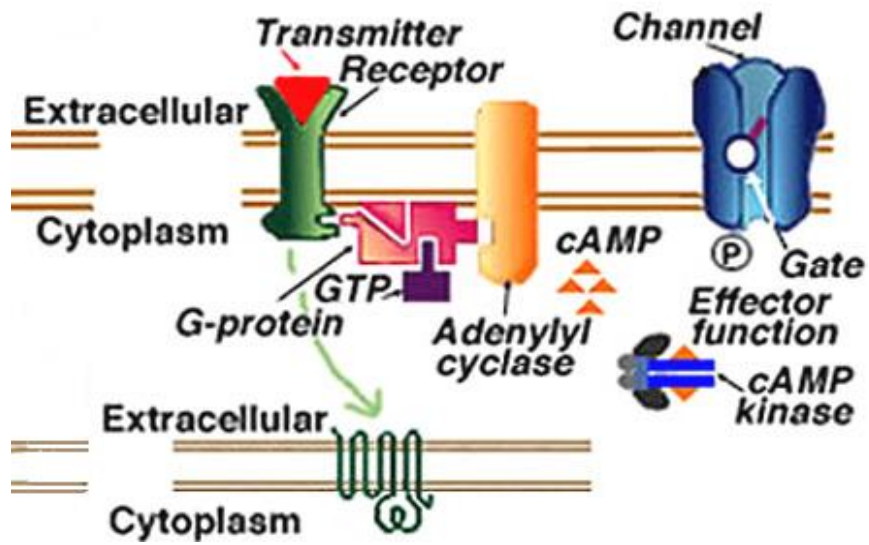


Figura 13: La figura mostra la struttura di un recettore metabotropico di gruppo II , associato all'adenilato ciclasi e a proteine canali voltaggio dipendenti (Principles of neuro science 1991; Kandel et al.).

Capitolo 4

Scopo del lavoro

L'obiettivo del mio lavoro è stato quello di valutare:

- il ruolo del recettore mGlu3 nei meccanismi di chemioresistenza del glioblastoma multiforme umano;
- la possibilità di modulare la risposta ai chemioterapici nelle cellule staminali tumorali derivanti da glioblastoma multiforme umano, utilizzando ligandi del recettore mGlu3 in associazione con i farmaci chemioterapici utilizzati nelle terapia attuale.

Per questo studio mi sono basato sulle seguenti informazioni ottenute dal mio gruppo di ricerca in lavori precedenti:

- il recettore mGlu3 è espresso e funzionale in colture di cellule staminali neurali murine isolate da SVZ;
- l'attivazione farmacologica dei recettori mGlu3 favorisce il mantenimento di un fenotipo cellulare proliferante in colture di cellule staminali neurali indotte a differenziare in astrociti;
- l'attivazione farmacologica dei recettori mGlu3 aumenta l'espressione di marker di progenitori neurali indifferenziati e riduce il numero di astrociti maturi in colture di cellule staminali esposte a stimoli differenziativi;
- la genesi e la crescita del glioblastoma è dovuto alla presenza di particolari cellule staminali presenti nella massa tumorale, le *Glioblastoma Stem Cells (GBSC)*;
- le cellule staminali neurali e le GBSC mostrano somiglianze fenotipiche e di comportamento non indifferenti;
- il recettore mGlu3 è espresso costitutivamente nelle cellule tumorali di glioma maligno (Arcella et al., 2005; D'Onofrio et al., 2003);
- le cellule staminali isolate da prelievi biopsici di glioblastoma multiforme sono resistenti ai farmaci chemioterapici utilizzati nelle terapie standard (Ricci-Vitiani et al., 2006)

Partendo da questi dati e accogliendo l'ipotesi di una genesi "staminale" del glioblastoma maligno umano, e considerata, inoltre, l'analogia tra i meccanismi che controllano la proliferazione delle Cellule Staminali Neurali e delle *GBSC*, i dati ottenuti dagli studi *in vitro* sul differenziamento delle cellule staminali neurali permettono di ipotizzare che farmaci antagonisti dei recettori mGlu3 potrebbero essere testati in terapie sperimentali volte ad inibire la proliferazione delle cellule staminali tumorali che originano e sostengono la crescita e la propagazione del tumore.

Evidenze sperimentali indicano inoltre che il recettore mGlu3 è costitutivamente espresso in cellule tumorali isolate da glioma maligno e in varie linee cellulari di glioma (Arcella et al., 2005; D'Onofrio et al., 2003) e che le cellule staminali isolate da glioblastoma producono e rilasciano quantità di glutammato sufficienti ad attivare i recettori mGlu3.

Sulla base di queste evidenze è stato interessante valutare il ruolo del recettore mGlu3 nei meccanismi di chemioresistenza del glioblastoma multiforme umano e nella modulazione della risposta di queste cellule alla chemioterapia convenzionale.

Lo studio ha preso in considerazione cinque linee di cellule staminali tumorali isolate da prelievi biotici di altrettanti pazienti con diagnosi di glioblastoma multiforme (*Glioblastoma Stem Cells*) facenti parte di uno studio che valuta la presenza di cellule staminali all'interno della biopsia come fattore prognostico. Sulle cellule così ottenute si è studiato, *in vitro*, la presenza e l'attività del recettore mGlu3 e il suo ruolo nei processi di proliferazione e differenziamento delle *GBSC* mediante l'uso di farmaci antagonisti e agonisti del recettore. Si è inoltre valutato, *in vivo*, l'effetto di agonisti e antagonisti del recettore mGlu3 in associazione con agenti alchilanti del DNA (in particolare con la temozolomide, farmaco di prima scelta nella terapia convenzionale del glioblastoma multiforme) sulla vitalità delle *GBSC in vitro*.

Capitolo 5

Materiali e Metodi

Farmaci

Temozolomide, cisplatino, irinotecan, etoposide, paclitaxel, 8Br-cAMP e cloruro di litio sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). UO-126 è stato acquistato dalla Promega (Milano, Italia). (2S,1'S,2'S)-2-(9-xantilmetil)-2-(2'-carbossiciclopropil) glicina (LY341495), acido (-)-2-oxa-4-aminobicyclo [3.1.0] esano-4,6 -dicarbossilico (LY379268) e 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirano-4-one cloridrato (LY294002) sono stati acquistati dalla Tocris Cookson Ltd (Bristol, UK). (3S)-1-(5-bromopirimidin-2-il)-N-(2,4-diclorobenzil) pirrolidin-3-ammina idrato metanosolfonato (LY2389575) è stato gentilmente fornito dalla Eli Lilly & Company (Indianapolis, IN). 4-metil-N1-(3-fenil-propil)-benzene-1,2-diammina (JSH-23) e salicilato di sodio sono stati acquistati dalla Santa Cruz (Santa Cruz, CA).

Coltura di cellule staminali tumorali isolate da GBM (GSCs)

Le cellule staminali tumorali utilizzate sono state ottenute da espianiti bioptici di 5 pazienti affetti da GBM, classificate secondo le linee guida del WHO. Sono state usate cellule staminali indifferenziate, derivate dal tessuto tumorale attraverso il taglio con una lametta, dissociazione meccanica e successiva centrifugazione per 3 minuti a 1000 rpm. Il pellet ottenuto è stato dissociato meccanicamente fino ad ottenere una sospensione di singole cellule che sono state poi coltivate in un mezzo privo di siero, formulato secondo il protocollo descritto da Di Giorgi Gerevini et al (2005). Il mezzo in cui sono state coltivate le cellule contiene DMEM/F12, glucosio 30%, HEPES, Eparina, Hormon Mix, BSA, Penicillina/Streptomicina 1 : 100 ed è stato addizionato con fattori di crescita, quali human recombinant EGF (20 ng/ml) e human recombinant bFGF (10 ng/ml). Le cellule sono state piastrate, nel mezzo così composto, in flask da 75 cm² e poste in un incubatore a 37°C. In queste condizioni di cultura le cellule proliferano formando aggregati caratteristici in sospensione, le neurosfere, che mantengono uno stato indifferenziato ed esprimono il marker di staminalità CD133 (Singh et al 2004). Per permettere alle sole cellule indifferenziate di espandersi e per eliminare i precursori, che si dividono più lentamente, le cellule sono state raccolte in un tubo

Falcon e centrifugate per 10 minuti a 1000 rpm. Il pellet è stato poi dissociato meccanicamente e le cellule sono state ripiastrate nelle flask in presenza di mezzo fresco con i fattori di crescita.

Analisi FACS

Permette di estrarre fisicamente dal flusso del campione popolazioni cellulari in base a caratteristiche pre-impostate dall'operatore (positività per determinati antigeni e/o caratteristiche morfologiche, etc.).

Questa metodica è stata utilizzata per separare cellule CD133+ dalle altre cellule presenti nel campione. Per poter procedere al sorting le cellule sono state raccolte e centrifugate per 10 minuti a 1000rpm, sono state disgregate meccanicamente in PBS in modo da ottenere una sospensione di singole cellule che, successivamente, sono state trattate con:

- _ Anticorpo primario monoclonale mouse anti-CD133 (Mylteni Biotec, 1 : 10) in PBS con lo 0.1% di Triton X (Sigma) per 4 ore
- _ Anticorpo secondario anti-mouse fluorescinato (Vector Lab, 1 : 100) per 1 ora.

RT-PCR

Estrazione RNA

Per determinare la presenza del recettore metabotropico del glutammato sottotipo 3, si è proceduto all'estrazione dell' RNA, seguita da RT-PCR. Questa tecnica ci permette di distinguere tra i recettori metabotropici sottotipo 2 e sottotipo 3 poichè, in commercio, non esiste un anticorpo in grado di distinguerli mediante l'analisi Western Blot. La RT-PCR ci permette, quindi, attraverso l'analisi del trascritto, di osservare quale delle due forme recettoriali viene espressa dalle nostre cellule. L'estrazione dell' RNA dalle cellule in sospensione è stata eseguita mediante l'utilizzo del Trizol (Invitrogen), dopo aver raccolto e centrifugato le cellule per 10minuti a 1000rpm. Il Trizol è una soluzione monobasica di guanidina isotiocianato che lisa le cellule lasciando intatto l'acido nucleico. Gli estratti cellulari sono stati poi conservati a -80°C fino al momento di estrarre l'RNA. Per procedere all'estrazione dell'acido ribonucleico è stato aggiunto, ad ogni campione, del cloroformio (125ml per 500ml di Trizol) e, successivamente, i campioni sono stati centrifugati a 13300rpm a 4°C per 15minuti. L'aggiunta del cloroformio e la centrifugazione determinano la

separazione del campione in due fasi: una fase acquosa superiore, contenente RNA, e una fase inferiore, contenente il restante materiale cellulare. Dopo aver raccolto la fase acquosa, l' RNA è stato fatto precipitare per 10minuti a temperatura ambiente in isopropanolo (125ml per 500ml di Trizol) e di nuovo si è proceduto ad una centrifugazione per 10minuti a 13300rpm a 4°C. Il pellet è stato, infine, sospeso in etanolo al 75% e centrifugato per 10minuti a 10500rpm a 4°C. L' RNA è stato fatto asciugare all'aria e poi risospeso in acqua sterile nel volume desiderato.

Determinazione della concentrazione di RNA

La concentrazione dell' RNA è stata determinata misurandone la densità ottica (OD) o l' assorbanza (A). Un'aliquota di RNA, del quale si vuole determinare la concentrazione, è stata opportunamente diluita in acqua sterile ed è stato misurato l'assorbimento a 260nm (picco di assorbanza tipico degli acidi nucleici) e a 280nm (picco di assorbanza caratteristico delle proteine). Il rapporto tra l'assorbanza a 260nm e quello a 280nm ci dà l'indice di purezza del campione, ottimale se compreso tra i valori di 1.8 e 2.

Reazione di sintesi del cDNA

L' RNA messaggero estratto è stato convertito in cDNA, a tale scopo vengono retrotrascritti 2µg di RNA estratto. Il protocollo della reazione è stato il seguente:

- _ RNA,
- _ 1µl di Oligo(dT) 12 -18 (500µg/ml),
- _ acqua sterile demineralizzata fino a 12µl,
- _ la miscela è stata scaldata a 94°C per 30 secondi ed è stata posta in ghiaccio per altrettanti 30secondi.

A questo punto sono stati aggiunti:

- 5 unità di inibitore della Rnasi,
- 4µl di buffer first standard 5X (Invitrogen),
- 2µl di DTT 0.1 M,
- 1µl di dNTP mix 10mM,
- 1µl di SuperScript II 200U/ml (BRL life Tech),
- acqua sterile demineralizzata fino ad un volume di 30µl.

La miscela è stata incubata a 37°C per un'ora. Il cDNA ottenuto è stato risospeso in acqua fino al volume di 100µl ed è stato conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Reazione di PCR

La PCR è stata utilizzata per l'amplificazione della sequenza genica del mGluR3. La reazione è stata condotta in un volume totale di 30µl con i seguenti componenti:

- _ 6µl di Buffer 5X (Roche),
- _ 1µl di dNTP mix 10mM,
- _ 1µl di primer Forward 100ng/ml,
- _ 1µl di primer Reverse 100ng/ml,
- _ 0.15µl di Taq Polimerasi (5U/ml ; Roche),
- _ 1µl di cDNA da amplificare,
- _ acqua sterile demineralizzata per portare a volume.

La reazione di PCR è stata, quindi, suddivisa nelle seguenti fasi:

- prima fase a 94°C per 3minuti (permette la denaturazione completa del DNA);
- seconda fase composta da 40-45 cicli di amplificazione, ognuno dei quali corrisponde a:
 - una fase di denaturazione a 94°C per 30secondi;
 - una fase di appaiamento alla temperatura appropriata dei primers utilizzati per 30secondi;
 - una fase di allungamento a 72°C per 30secondi;
 - uno step di estensione finale di 10minuti a 72°C;
- la miscela è stata portata a 4°C fino al momento dell'analisi.

Le sequenze dei primers utilizzati sono state le seguenti:

- mGlu2

Forward: CTACAGTGATGTCTCCATCC

Reverse: AAAGCCTCAATGCCTGTCTC

- mGlu3

Forward: CAAGTGACTACAGAGTGCAG

Reverse: CTGTCACCAATGCTCAGCCTC

- β-Actina

Per l'amplificazione della β-Actina sono stati usati i primers descritti da Roelen et al 1994, che comprendono un introne e permettono di individuare prodotti di differente peso molecolare in base

all'entità del DNA templatato amplificato, cDNA o DNA genomico (400pb e 600pb rispettivamente) ed individuare eventuali contaminazioni.

Elettroforesi orizzontale su gel di Agarosio

I prodotti della PCR sono stati analizzati grazie all'elettroforesi su gel di agarosio (1g di agarosio in 100ml di TAE buffer), contenente bromuro d'Etidio (Bio-Rad) alla concentrazione finale di 0.5mg/ml. L'elettroforesi in TAE 1X è stata eseguita ad un voltaggio costante di 80V/cm² per circa 50minuti. Per determinare il peso molecolare e, quindi, la lunghezza dei campioni, in uno dei pozzetti del gel è stato caricato un marker di peso molecolare.

Western blot

Estrazione e dosaggio proteico

Per l'estrazione delle proteine si è proceduto alla raccolta delle cellule e alla loro successiva centrifugazione per 10minuti a 1000rpm. È stato rimosso il surnatante e il pellet è stato risospeso in 200µl di Buffer di lisi (Tris pH7.5 0.1 M, NaCl 0.5M, PMSF 0.1 M, βGliceraldeide 25mM, Aprotinina 1µl, Leupeptina 1µl). Il pellet, così risospeso, è stato centrifugato per 10minuti a 10000rpm. Questo passaggio ha permesso di separare il materiale proteico (il surnatante) dagli scarti cellulari (pellet). I campioni ottenuti, a questo punto, sono stati dosati allo spettrofotometro: è stata preparata una Mix costituita da 800µl di acqua e 200µl di protein assay (Bio-rad) per ciascun campione. Il campione, diluito 1 : 500, è stato letto allo spettrofotometro alla lunghezza di 595nm. In base all'assorbanza è stata calcolata la quantità, in µg di proteina per 2µl di campione, estrapolando tale concentrazione da una curva di riferimento costruita con concentrazioni note di BSA.

Analisi Western Blot

I campioni sono stati addizionati con il 25% di sample buffer che riduce i ponti disolfuro delle proteine, le quali acquisiscono così una struttura lineare e potranno essere divise in base al loro peso molecolare. I campioni sono stati, poi, denaturati per 30minuti a 37°C e caricati su un gel di acrilamide all' 8% visto che il peso molecolare del recettore è di 105 kDa. Per ogni pozzetto sono stati caricati 40µg di campione e in uno dei pozzetti è stato caricato un marker di peso molecolare.

La separazione elettroforetica è stata eseguita ad un voltaggio pari a 120V, per il superamento dello stacking e in seguito a 100V per il running, utilizzando come soluzione conduttrice un tampone di corsa (Running Buffer) costituito da: 1g Tris, 14g Glicina, SDS 1% in 1L di acqua distillata. Dopo la corsa è stato eseguito il trasferimento su membrana di nitrocellulosa utilizzando un tampone di trasferimento costituito da: 1g Tris, 14.4 g di Glicina, 200ml di metanolo in 1L di acqua distillata. Il trasferimento è stato eseguito per 1ora a 100V. Dopo il trasferimento la membrana è stata messa in agitazione per 5minuti in presenza di Rosso Ponceau che, legando le proteine, permette di verificare la correttezza del trasferimento e del caricamento. La membrana è stata posta per circa 1ora in una soluzione di TBS e latte (no fat dry milk) al 5% allo scopo di bloccare i siti aspecifici e successivamente è stata incubata con un anticorpo policlonale anti-mGluR2/3 (Upstate; rabbit) 1.5µg/ml in una soluzione con TBS, latte in polvere al 3% e Tween20 allo 0.05% overnight, in costante agitazione, alla temperatura di 4°C. La membrana è stata poi incubata con un anticorpo secondario anti-rabbit (Chemicon) 1 : 5000, diluito in TBS, 3% di latte in polvere e 0.05% di Tween20, per circa 1ora.

Per quanto riguarda l'analisi tramite western blot della MGMT la percentuale del gel di acrilamide è stata del 15%. È stato utilizzato un anticorpo policlonale rabbit anti-MGMT (Cell Signaling 1 : 500) diluito in TBS-T 0.1% con il 3% di BSA e la membrana è stata incubata con questo anticorpo overnight a 4°C in costante agitazione. L'anticorpo secondario utilizzato è stato un anti-rabbit (Chemicon) 1 : 5000 diluito in TBS, 5% latte in polvere e 0.1% di Tween20, per circa 1ora.

Per Akt, infine, è stato utilizzato un gel di acrilamide al 10% poiché il peso molecolare della proteina è di 60kDa. La membrana, dopo il trasferimento, è stata incubata con un anticorpo policlonale anti fosfo Akt rabbit (Cell Signaling, 1 : 500) overnight e con un secondario anti-rabbit della Chemicon usato 1 : 5000, diluito in TBS, 5% latte in polvere e 0.1% di Tween20, per circa 1ora.

La rilevazione delle proteine è avvenuta attraverso l'utilizzo dell'ECL (Amersham), un prodotto che fornisce il substrato adatto all'enzima perossidasi legato agli anticorpi secondari utilizzati. La membrana, dopo essere stata incubata per 1ora con l'anticorpo secondario anti-rabbit, è stata sottoposta ad una nuova incubazione per 3minuti con l'ECL e successivamente è stata posta in una cassetta di sviluppo assieme ad una lastra impressionabile dalla reazione chemiluminescente generata dalla perossidasi in presenza del proprio substrato. Tale reazione, impressionando la lastra, ha permesso di individuare la proteina di nostro interesse.

Misurazione dei livelli intracellulari di AMP ciclico

Le cellule sono state incubate in Krebs-Henseleit Buffer, contenente 0.5 mM isobutilmetilxantina, per 15 minuti a 37°C sotto costante ossigenazione. Dopo l'aggiunta di foscolina e/o di ligandi del recettore mGlu3, le cellule sono state incubate per altri 20 minuti. La reazione è stata poi bloccata con l'aggiunta di 0.8N HClO₄ freddo e i campioni sono stati sonicati e centrifugati a bassa velocità. Dopo l'aggiunta di K₂CO₃ i campioni sono stati centrifugati e i surnatanti ottenuti sono stati utilizzati per la valutazione di AMPc mediante saggio RIA (GE Healthcare, Milano, Italia).

Trasfezione transiente su cellule staminali tumorali

La trasfezione transiente delle cellule staminali tumorali di glioma è stata eseguita attraverso l'utilizzo di un kit commerciale costituito da una soluzione di lipidi cationici, la Lipofectamina 2000 (Invitrogen). La lipofectamina, carica positivamente, interagisce con lo scheletro di zucchero fosfato del DNA formando dei complessi che mantengono la carica positiva. Tali complessi, a loro volta, aderiscono alla membrana cellulare e vengono incorporati attraverso endocitosi. Questo meccanismo non permette al costrutto inserito di integrarsi nel DNA cellulare, così il frammento viene perduto entro pochi cicli di replicazione. Le cellule staminali sono state trasfettate con un costrutto contenente il gene della proteina Akt, posta sotto il controllo di un promotore forte che ne permette una trascrizione costitutiva. La trasfezione è avvenuta sfruttando il metodo della Lipofectamina secondo il seguente protocollo:

- _ le cellule sono state raccolte e seminate ad una densità di 2×10^6 cellule per piastra;
- _ le cellule seminate sono state lasciate in coltura per un giorno e successivamente incubate per 4ore con 10 μ l di reagente specifico LipofectA-MINE e 10 μ g di costrutto contenente il gene di Akt;
- _ le cellule sono state mantenute in condizioni indifferenziate per 24 e 48 ore dopo trattamento con Temozolomide e/o LY341495.

Trasfezione con siRNA

Le cellule staminali tumorali sono state trasfettate con siRNA per il gene mGluR3 utilizzando un kit commerciale fornito dalla Qiagen. Prima di procedere alla trasfezione, le cellule sono state seminate ad una densità di 5×10^5 per pozzetto, in piastre da 96well, in 100 μ l di mezzo di coltura contenente siero e antibiotici e lasciate in incubatore a 37°C overnight. Il giorno successivo sono stati diluiti 150ng di siRNA in 100 μ l di mezzo, senza siero, al fine di avere una concentrazione finale, nel

pozzetto, di 5nM. Successivamente è stato aggiunto 1µl di HiPerFect Reagent per diluire il siRNA, lasciando i campioni in incubazione per 10minuti. Una volta completata, la mix è stata aggiunta alle cellule lasciandole nelle loro normali condizioni di crescita. La trasfezione è stata bloccata dopo 24 e 48 ore dalla somministrazione di Temozolomide e/o LY341495. Sono stati utilizzati due diversi siRNA per il gene mGluR3, disegnati in zone diverse del gene:

- siRNA1(Hs_GRM3_1)

filamento senso = 5'-GGUCCUUGUUGUAAACUAAUTT-3'

filamento antisenso = 5'-AUUAGUUACAACAAGGACCTA-3'

- siRNA (Hs_GRM3_4)

filamento senso = 5'-GCGCCAAACUCAGUGAUAATT-3'

filamento antisenso = 5'-UUAUCACUGAGUUUGGCGCTG-3'

Saggio di vitalità

Il saggio di vitalità, effettuato dopo il trattamento con la Temozolomide, LY341495 e la combinazione dei due farmaci, è stato eseguito con il kit della Promega: CellTiter 96 Aqueso one solution cell proliferation assay. Questo kit consiste di un'unica soluzione contenente un sale di tetrazolio, il [3-(4; 5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3 carbossimetossifenil)-2-(4 sulfopenil)-2Htetrazolio] (TMS) e la fenazina etosolfata (PES). Il TMS è bioridotto dalle cellule metabolicamente attive con formazione di un composto colorato del formazano. La riduzione del TMS avviene ad opera del NADH prodotto. Esiste una correlazione lineare tra il numero di cellule attive e la quantità di composto ridotta e di conseguenza tra l'assorbanza del mezzo, dovuta al composto colorato, e la quantità di cellule metabolicamente attive. Il PES ha, invece, il ruolo di accettore di elettroni e stabilizza la reazione. Il protocollo eseguito per effettuare il saggio è stato il seguente:

- _ aggiunta di 20 ml di soluzione TMS in 100 ml di mezzo all'interno di ciascun pozzetto;
- _ incubazione da 1 a 4 ore;
- _ lettura dell'assorbanza a 490nm mediante uno spettrofotometro per piastre da 96 well.

Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

Permette di precipitare frammenti di DNA associato a proteine utilizzando specifici anticorpi in grado di riconoscere la proteina stessa. Il protocollo sperimentale prevede le seguenti fasi:

1. la fissazione delle proteine istoniche al DNA mediante l'uso di formaldeide;
2. la rottura del DNA in frammenti di piccole dimensioni (da 500 a 2000 pb) mediante sonicazione;

3. l'immunoprecipitazione dei complessi DNA-proteine istoniche mediante l'utilizzo di anticorpi specifici in grado di riconoscere le suddette proteine;
4. la separazione dei frammenti di DNA immunoprecipitati dalle proteine istoniche ad essi associate e la digestione delle proteine stesse;
5. la purificazione dei frammenti di DNA da sottoporre a successiva PCR;
6. analisi quantitativa dei campioni mediante Realtime PCR.

I campioni sono stati raccolti, lavati 2 volte in PBS e centrifugati a 1000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. I sedimenti cellulari sono stati risospesi in 10 ml di PBS, addizionati di 1ml di tampone di fissazione [NaCl 0.1 M; EDTA 1 mM pH= 8; EGTA 0.5 mM pH= 8; Hepes 50 mM; H₂O;

Formaldeide 11%] ed incubati per 10 minuti a temperatura ambiente al fine di favorire la reazione di fissazione delle proteine al DNA. Al termine del periodo di incubazione, la reazione di fissazione è stata bloccata incubando le sospensioni in ghiaccio per 5 minuti in presenza di 750µl di glicina 2.5M. I sedimenti cellulari, ottenuti mediante centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti a 4°C, sono stati lavati 2 volte con PBS freddo e successivamente risospesi in 1 ml di tampone di lisi [SDS 1%; EDTA 5 mM; Tris-HCl 50 mM pH= 8; set di inibitori delle proteasi; set di inibitori delle fosfatasi diluito 1 : 100; sodio butirato 10 mM]. Dopo 36 cicli di sonicazione (1 ciclo= 20 secondi ad una potenza del 20%) le sospensioni sono state centrifugate a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C ed i surnatanti sono stati trasferiti in nuove provette:

_ 50µl di ciascun surnatante (frazione input contenente tutti i frammenti di DNA derivati dalla sonicazione) sono stati prelevati e congelati a -20°C;

_ 10µl di ciascuna frazione input sono stati utilizzati per determinare l'idoneità del grado di frammentazione mediante corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1% in tampone TAE 1X addizionato di bromuro di etidio;

_ il surnatante rimanente (circa 450µl/campione), è stato diluito in rapporto di 1 : 10 in tampone di diluizione [Triton X-100 1%; EDTA 2 mM pH= 8; Tris-HCl 20 mM pH= 8; NaCl 150 mM; set di inibitori delle proteasi; set di inibitori delle fosfatasi diluito 1 : 100; sodio butirato 10 mM] e successivamente suddiviso in 3 aliquote: a ciascuna aliquota di cromatina (circa 1 ml) sono stati aggiunti 50µl di siero preimmune di topo e 50µl di proteina A/G sepharose per eliminare componenti aspecifiche eventualmente presenti nei due campioni. Dopo un'incubazione di 2 ore a 4°C in agitazione, tutte le sospensioni sono state centrifugate a 2000 rpm per 5 minuti a 4°C per rimuovere la

proteina A/G sepharose. Ai surnatanti ottenuti in questa fase sono stati aggiunti, rispettivamente: anticorpi Anti-IgG (controllo negativo), anticorpo anti-RNA Pol II (controllo positivo) e anticorpi

specifici in grado di riconoscere NFκB (1 : 500, 3035], Cell Signaling Technology, Danvers, MA). I campioni sono stati quindi incubati a 4°C per 24 ore in agitazione. Il giorno successivo, a ciascun campione sono stati aggiunti 20µl di proteina A/G sepharose. Al termine del periodo di incubazione (30 minuti a 4°C in agitazione), gli immunocomplessi DNA-istone-anticorpo specifico (o DNA-istone-siero pre-immune), presenti in ciascun campione, legati alla proteina A/G sepharose, sono stati sedimentati mediante centrifugazione a 2000 rpm (centrifuga Eppendorf 5415R) per 5 minuti e sottoposti a lavaggio (5 minuti/lavaggio) con i seguenti tamponi: tampone I [SDS 0.1%; Triton X-100 1%; EDTA 2 mM pH= 8; NaCl 150 mM; Tris-HCl 20 mM pH= 8; set di inibitori delle proteasi; set di inibitori delle fosfatasi diluito 1 : 100; sodio butirrato 10 mM], tampone II [SDS 0.1%; Triton X-100 1%; EDTA 2 mM pH= 8; NaCl 500 mM; Tris-HCl 20 mM pH= 8; set di inibitori delle proteasi; set di inibitori delle fosfatasi diluito 1 : 100; sodio butirrato 10 mM], tampone III [LiCl 0.25 M; NP-40 1%; Sodio Desossicolato 1%; EDTA 1 mM pH= 8; Tris-HCl 10 mM pH= 8; set di inibitori delle proteasi; set di inibitori delle fosfatasi diluito 1 : 100; sodio butirrato 10 mM]. Infine sono stati eseguiti 3 lavaggi (2 minuti/ lavaggio) con tampone TE [Tris-HCl 10 mM pH= 8; EDTA 1 mM pH= 8; con aggiunta di un set di inibitori delle proteasi; un set di inibitori delle fosfatasi diluito 1 : 100; sodio butirrato 10 mM]. Ad ogni lavaggio, gli immunocomplessi legati alla proteina A/G sepharose sono stati sedimentati mediante centrifugazione a 2000 rpm per 2 minuti e, al termine dei lavaggi, ad ogni sedimento ottenuto sono stati aggiunti 150µl di soluzione di recupero [SDS 1%; NaHCO₃ 0.1M]. Dopo incubazione per 20 minuti in agitazione, i campioni sono stati centrifugati a 2000 rpm a temperatura ambiente per 5 minuti ed i surnatanti sono stati trasferiti in nuove provette. Parallelamente la soluzione di recupero è stata aggiunta alla frazione input congelata a -20°C. Ad ogni surnatante è stata addizionata proteinasi K (0.2µg/µl) e le miscele sono state incubate a 65°C per 16 - 24 ore per favorire la separazione dei frammenti di DNA dalle proteine istoniche formanti gli immunocomplessi.

Purificazione dei frammenti di DNA immunoprecipitati

Per la purificazione dei frammenti di DNA immunoprecipitati è stato utilizzato il sistema QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) che si basa sull'uso di colonne dotate di una membrana a matrice silicea che, in presenza di alte concentrazioni di sali, lega selettivamente il DNA presente nel campione. Dopo aver aggiunto 5 volumi di tampone PB I (contenente guanidina idrocloruro e isopropanolo) ad 1 volume di ciascun campione, le miscele sono state trasferite nelle colonne per la purificazione di frammenti di DNA, fornite dal sistema. I campioni sono stati quindi centrifugati per 1 minuto a 13000 rpm e successivamente sottoposti ad un lavaggio con 750µl di tampone PE

(contenente etanolo). I frammenti di DNA sono stati infine eluiti da ciascun campione aggiungendo 50µl di acqua ultrapura al centro della colonna e centrifugando, dopo 1 minuto di incubazione a temperatura ambiente, a 13000 rpm.

Valutazione dell'espressione di mGluR3 in tessuto cerebrale umano

L'espressione dei recettori mGlu3 è stata valutata utilizzando One-Step qRT-PCR KAPA SYBR FAST kit (KAPABIOSYSTEMS, Boston, MA). L'analisi è stata eseguita su 67 campioni di GBM e su 20 campioni di tessuto cerebrale umano che non mostravano anomalie istologiche (usato come controllo normale). 100 ng di mRNA di ogni campione sono stati retrotrascritti e amplificati in un volume di reazione di 25µl con: 12.5µl di 2x KAPA Sybr FAST qPCR master mix, 0.5µl di KAPA RT mix (50x), primers forward e reverse 200nM e DNase/RNase free water. Le sequenze dei primers utilizzati sono state le seguenti:

- mGlu3

Forward: 5'-GCAGTTTGTCTTGGTCAGCA-3'

Reverse: 5'-AACACACCCTTGGTCAAAGC-3'

- β-Actina

Forward: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

Reverse: 5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'

Programma di amplificazione: 10 minuti a 42 °C, 5 minuti a 95°C, 40 cicli di 10 secondi ciascuno a 95°C, 40 cicli di 30 secondi ciascuno a 60°C, 80 cicli a 55 + 0.5°C per l'appaiamento dei primers (temperatura di melting) utilizzando iCycler-iQ multicolor Real-Time PCR detection system (Bio-Rad, Milan, Italy). L'amplificazione della β-Actina è stata utilizzata come controllo interno. La specificità dei prodotti è stata valutata mediante sequenziamento diretto, utilizzando gli stessi primers usati per l'amplificazione. I dati sono stati forniti come rapporto tra il numero di copie del gene di interesse e il gene housekeeping (n° copie target/ n° copie β-Actina) e il rapporto è stato calcolato utilizzando il metodo $2^{-\Delta Ct}$.

Real Time-PCR

La Real Time PCR (eseguita con l' iCycler della BIORAD) rappresenta lo strumento di elezione per la quantificazione relativa e assoluta dei messaggeri perché permette di fare delle

valutazioni in breve tempo e con un minore errore, il tutto associato al ridotto numero di passaggi necessari per avere i dati definitivi. Con la tecnica di Real Time non sono infatti richieste manipolazioni post-amplificazione, con conseguente diminuzione dei tempi di ottenimento dei risultati e possibilità di monitorare costantemente l'andamento della reazione. La Real Time PCR è stata utilizzata per la determinazione quantitativa dei livelli di RNA messaggero delle MGMT in cellule trattate con Temozolomide e/o LY341495. Per la Real Time PCR sono state costruite delle curve standard per i geni di interesse e per un gene housekeeping, la β -Actina con diluizioni seriali 10^9 -10. E' stata, quindi, messa a punto la metodica effettuando tutte le prove necessarie ad ottenere le condizioni di massima efficienza di amplificazione. Gli ampliconi relativi ai cDNA dei geni testati sono stati rilevati mediante Sybr Green, fluoroforo intercalante simile all'etidio bromuro che, quando si lega al dsDNA, emette una fluorescenza in soluzione 200 volte superiore rispetto a quando si trova nella forma libera. L'utilizzo del Sybr Green non richiede la sintesi di sonde con sequenza specifica e potrebbe quindi legarsi a qualsiasi DNA, come i dimeri di primers e altri prodotti aspecifici, dando un segnale artefatto. Pertanto, la specificità di reazione è garantita dalla coppia di primers utilizzata ed è quindi importante disegnare i primers correttamente, verificando che non si trovino in regioni di alta omologia con altri geni. Per verificare la specificità del prodotto è necessario allestire, alla fine della PCR, una corsa di denaturazione aumentando lentamente la temperatura del campione oltre quella di melting dell'amplicone. Successivamente, graficando il logaritmo della fluorescenza in funzione della temperatura si ottiene una curva in cui, la presenza di un picco unico dimostra l'unicità e la specificità del prodotto di PCR. Una volta messe a punto le condizioni di reazione, le curve standard ed i campioni sono stati caricati in duplicato e le determinazioni quantitative relative della MGMT sono state valutate in rapporto all'espressione della β -Actina.

Per ogni campione e per ogni gene è stato ottenuto un valore di Ct (Threshold Cycle), definito come il ciclo a livello del quale la curva di cinetica della reazione interseca la Threshold stabilita (il termine Threshold indica una retta di soglia che interseca la curva di fluorescenza della reazione e che permette

di discriminare il segnale specifico dal segnale di rumore di fondo) e, per estrapolazione dalla curva standard, è stato ottenuto il corrispondente numero di copie dell'amplicato. I dati per ogni campione sono stati forniti come rapporto tra il numero di copie del gene di interesse e il gene housekeeping (n° copie target/ n° copie β -Actina).

La reazione è stata condotta in un volume totale di 30 μ l con i seguenti componenti:

- 6 μ l di Buffer 5x(Roche),

- 1µl di dNTP mix 10mM,
- 1µl di primer Forward 100ng/ml,
- 1µl di primer Reverse 100ng/ml,
- 0.15µl di Taq Polimerasi (5U/ml; Roche),
- 1µl di cDNA da amplificare,
- acqua sterile demineralizzata per portare a volume,
- Sybr Green 0.2x.

La reazione di PCR è stata, quindi, suddivisa nelle seguenti fasi:

- prima fase a 94°C per 3minuti (permette la denaturazione completa del DNA);
- seconda fase composta da 40-45 cicli di amplificazione, ognuno dei quali corrisponde a:
 - una fase di denaturazione a 94°C per 30secondi;
 - una fase di appaiamento alla temperatura appropriata dei primers utilizzati per 30secondi;
 - una fase di allungamento a 72°C per 30secondi;
 - uno step di estensione finale di 10minuti a 72°C;
 - la miscela è stata portata a 4°C fino al momento dell'analisi.

Le sequenze dei primers utilizzati sono state le seguenti:

- MGMT

Forward: CCGTTTGCGACTTGGTACTT

Reverse: CTCACAACCAGACAGCCTCCA

- β-Actina

Forward: CGCTGCCCTGAGGCAC

Reverse: TGTCCACGTCACACTTCAT

Impianto di cellule CSC GFP+ in topi nudi CD1 e valutazione della crescita tumorale

I topi nudi CD1 (Charles River, Calco, CO, Italia, 20-22 g di peso corporeo), sono stati tenuti in condizioni controllate (temperatura = 22°C, umidità = 40%) con cicli di luce/buio di 12 ore. Le GSCs sono state ingegnerizzate in modo da esprimere la proteina fluorescente verde (GFP). Il giorno dell'impianto, gli animali sono stati anestetizzati utilizzando ketamina (100mg/kg,ip)/xylazina(10mg/kg,i.p) e sottoposti ad infusione stereotassica delle GSCs GFP+ (0.5x 10⁶ cellule/5µl) ad un flusso di 1µl/minuto a livello del nucleo caudato sinistro utilizzando le seguenti coordinate:

- 0.6 mm anteriore al bregma;
- 1.7 mm lateralmente alla linea mediana,
- 3.5 mm ventrale dalla superficie del cranio (secondo l'atlante di Franklin e Paxinos2).

Dopo l'infusione l'ago è stato lasciato in posizione per 5 minuti prima di essere rimosso.

15 o 45 giorni dalla data dell'impianto cellulare, gli animali sono stati trattati, mediante l'uso di minipompe osmotiche (Alzet), o con soluzione salina o con LY341495 (3mg/kg/die) ricevendo contemporaneamente tre iniezioni o di soluzione salina o di temozolomide (70mg/kg,ip). I topi sono stati sacrificati 1 mese dopo l'inizio del trattamento e i cervelli sono stati utilizzati per l'analisi istologica, effettuata attraverso la colorazione con ematossilina/eosina (abbreviata EE). L'ematossilina colora in blu-violaceo i componenti cellulari carichi negativamente (come acidi nucleici, proteine di membrana, membrane cellulari, elastina), mentre l'eosina colora in rosso-rosato i componenti carichi positivamente (come molte proteine cellulari, le proteine mitocondriali, le fibre collagene).

La crescita tumorale è stata valutata mediante microscopia a fluorescenza, in base alla presenza delle GSCs GFP+, dando i seguenti punteggi:

0 - Nessun GSCs GFP+

1 - Presenza di GSCs GFP+ nel sito di iniezione

2 - Presenza di GSCs GFP+ nella porzione mediale del nucleo caudato vicino alla parete del ventricolo laterale

3 - Presenza di GSCs GFP+ in circa il 50% del nucleo caudato sinistro

4 - Presenza di GSCs GFP+ nell'intero nucleo caudato e infiltrazione del setto ipsilaterale

5 - Presenza di GSCs GFP+ nell'intero nucleo caudato, infiltrazione sia del setto ipsilaterale che del corpo calloso

6 - Presenza di GSCs GFP+ nell'intero nucleo caudato, infiltrazione sia del setto ipsilaterale che del corpo calloso e una infiltrazione parziale dell'emisfero controlaterale

7 - Presenza di GSCs GFP+ nell' intero nucleo caudato e infiltrazione sia del setto ipsilaterale che del corpo calloso che dell' emisfero controlaterale.

Patient population

67 pazienti adulti sono stati arruolati (43 uomini e 24 donne) e sono stati sottoposti a craniotomia nel comparto sopratentoriale per la resezione di GBM. Dopo l'intervento chirurgico tutti i pazienti sono stati trattati con radioterapia adiuvante (2Gy per frazione, una volta al giorno, 5giorni a settimana, dose di 60Gy totali) e TMZ presso l'Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma. Tutti i pazienti hanno fornito consenso informato scritto, approvato dal Comitato Etico dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma. I pazienti affetti da GBM secondario non sono stati inclusi nel reclutamento.

Le aree tumorali selezionate per l'estrazione del DNA contenevano almeno l'80% di cellule tumorali. La sopravvivenza dei pazienti è stata calcolata a partire dalla data dell'intervento chirurgico fino alla morte o al termine del follow-up. L'indice di marcatura Ki-67 è stato definito come la percentuale di nuclei positivi su un totale di 2000 cellule tumorali, contate utilizzando una griglia oculare. I nuclei positivi sono stati contati senza una preventiva conoscenza delle informazioni relative alla prognosi del paziente.

Capitolo 6

Risultati

Per i nostri esperimenti sono state utilizzate 5 diverse linee di glioblastoma multiforme isolate da cinque diversi espianti biotipici provenienti da altrettanti pazienti. Tutti i cloni (denominati A, B, C, D ed E), ottenuti dall'amplificazione delle 5 linee cellulari, sono in grado di crescere in aggregati (sfere tumorali) mantenendo lo stato indifferenziato come suggerito dall'espressione di marker di precursori neurali. Le cellule CD 133+ sono state *sortate* attraverso il FACS ed è stata valutata l'espressione di Sox2 e Musashi1 ,marker di staminalità, per immunofluorescenza indicando che il 73; 2% delle cellule esprime Sox2 mentre il 62;5% esprime Musashi1 (Fig.6.1).

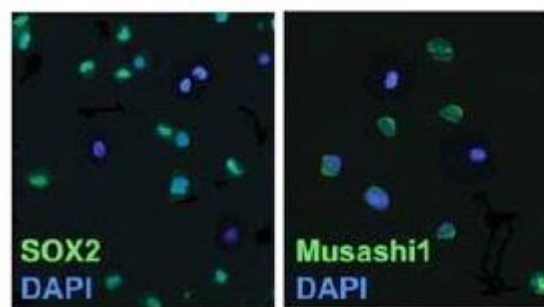


Figura 6.1: Valutazione dell'espressione di Sox2 e Musashi1 ,marker di staminalità, per immunofluorescenza di cellule CD133+.

Espressione del recettore del Glutammato sottotipo 3 in cellule staminali di glioblastoma multiforme:

E' stato accertato sia tramite RT-PCR, sia attraverso Western Blot, che le cellule esprimessero recettori metabotropici del glutammato. Sono state utilizzate entrambe le tecniche poiché la PCR, a differenza del western blot, permette di distinguere tra il recettore metabotropico sottotipo 2 e il sottotipo 3 che invece, nel western blot, non sono distinguibili in quanto l'anticorpo si lega ad un epitopo che i due recettori hanno in comune all'estremità C-terminale. La PCR ha mostra che le 5 linee cellulari esprimono tutte il recettore metabotropico del glutammato sottotipo 3, mentre il

sottotipo 2 è del tutto assente. Il saggio di western blot mostra due bande: una del peso di 100kDa che corrisponde al monomero del recettore ed una più pesante a circa 200kDa corrispondente al dimero (fig.6.2). Successivamente è stato controllato l'effettivo funzionamento del recettore. La prima via che è stata saggiata è quella del cAMP, attraverso la somministrazione di un agonista del mGluR 2/3, LY379268. L'aggiunta dell'agonista blocca la formazione del cAMP stimolata da 10 μ M di forskolin ed aumenta i livelli di fosforilazione dell'AkT, che si trova a valle della PI3K e delle ERK1/2. Questi effetti risultano annullati in presenza dell'antagonista del recettore mGlu 2/3, LY341495. Questi risultati hanno portato alla conclusione che tutte e 5 le linee cellulari esprimono il recettore metabotropico del glutammato sottotipo 3, che esso è attivo e accoppiato a diversi pathways di trasduzione del segnale:

- Inibizione della sintesi di AMPc (Fig.6.3).
- Attivazione della PI3K (Fig.6.4).
- Attivazione della pathway delle MAP chinasi (Fig.6.5).

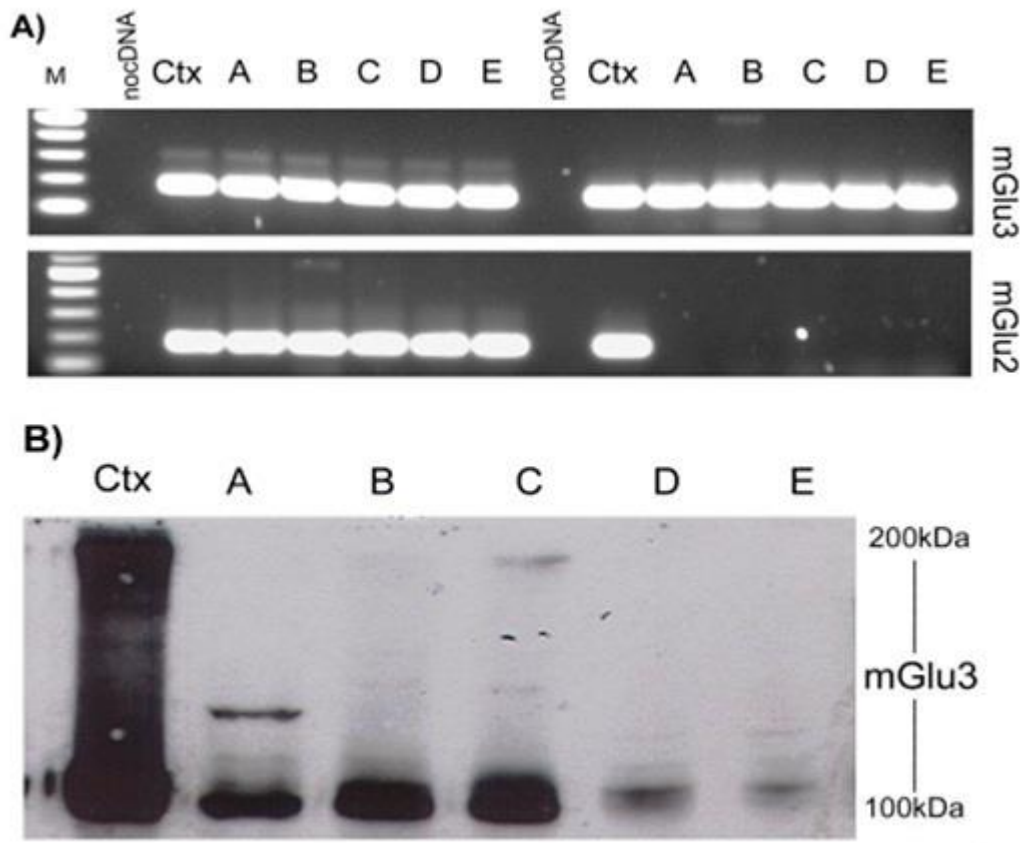


Figura 6.2: A: prodotti di PCR ottenuti da campioni di cDNA provenienti dai 5 cloni in studio. B: Western Blot relativo ai 5 cloni.

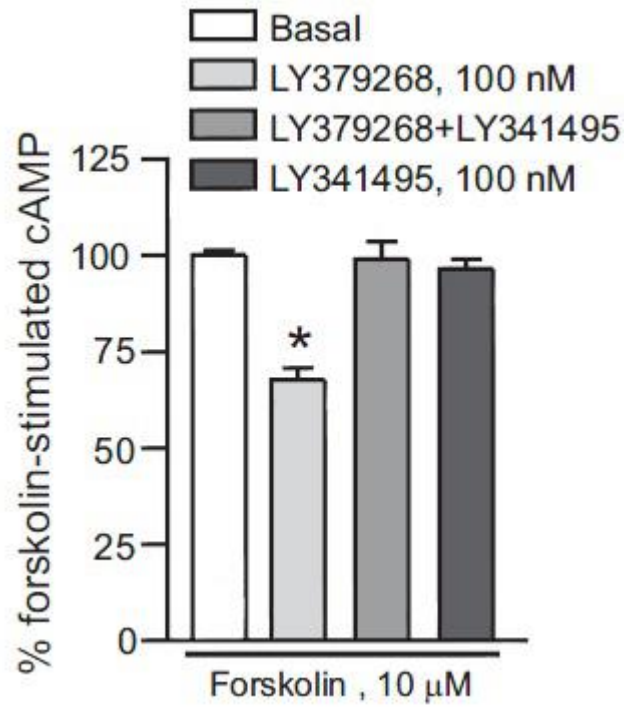


Figura 6.3: La somministrazione di forskolin, alla concentrazione di 10mM, attiva la via del cAMP i cui livelli risultano notevolmente diminuiti in presenza dell'agonista del recettore mGlu3, LY379268. (One Way ANOVA + Test di Fisher LSD).

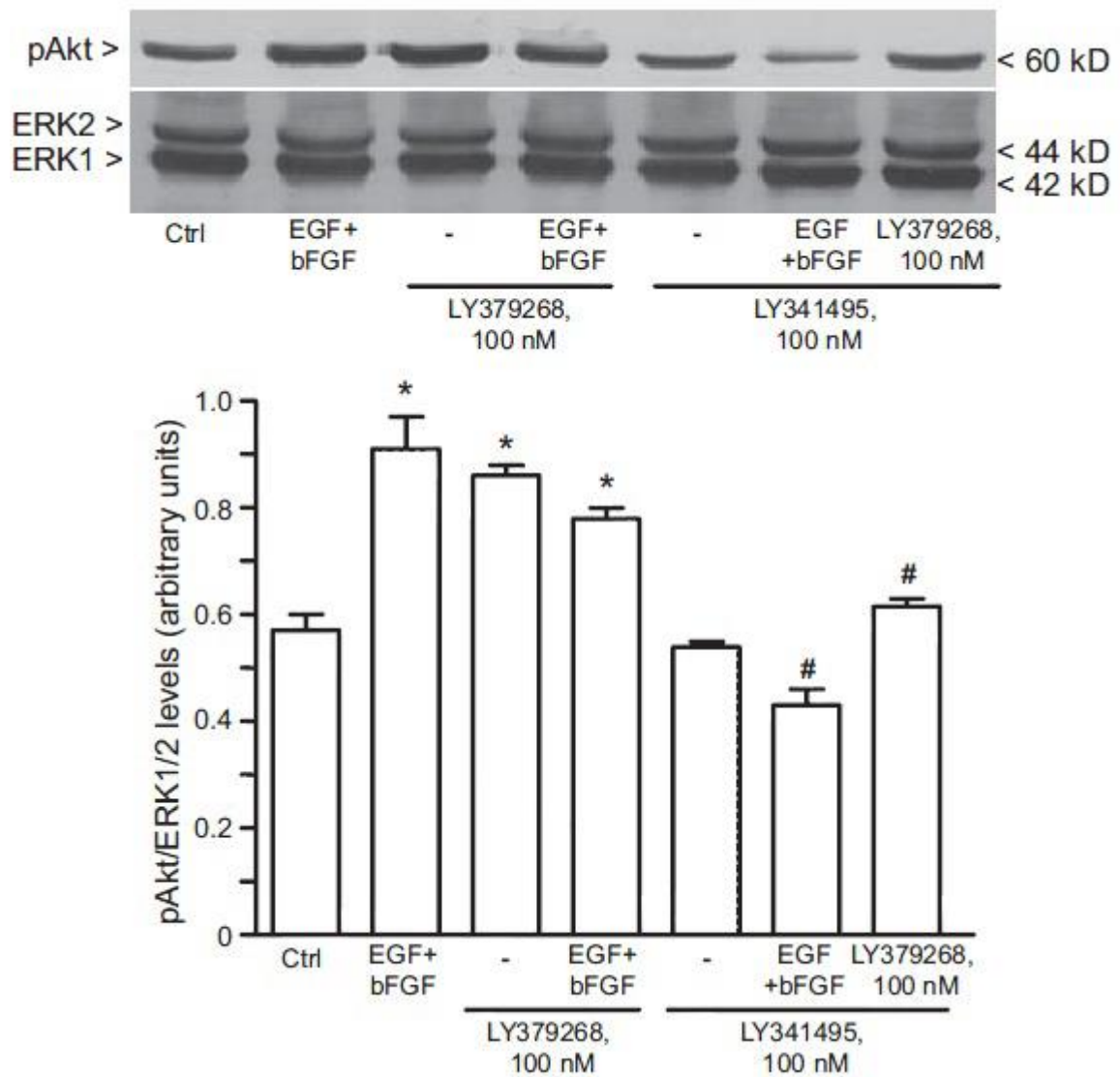


Figura 6.4: Attivazione da parte del recettore mGlu3, della via della PI3K in presenza del suo agonista farmacologico, LY379268. Come mostrato dal western blot, lo LY379268 determina un incremento della forma fosforilata di Akt, una chinasi che si trova a valle della PI3K, mentre in presenza dell'antagonista farmacologico del recettore mGlu3, lo LY341495, i livelli di Akt fosforilata risultano notevolmente ridotto.

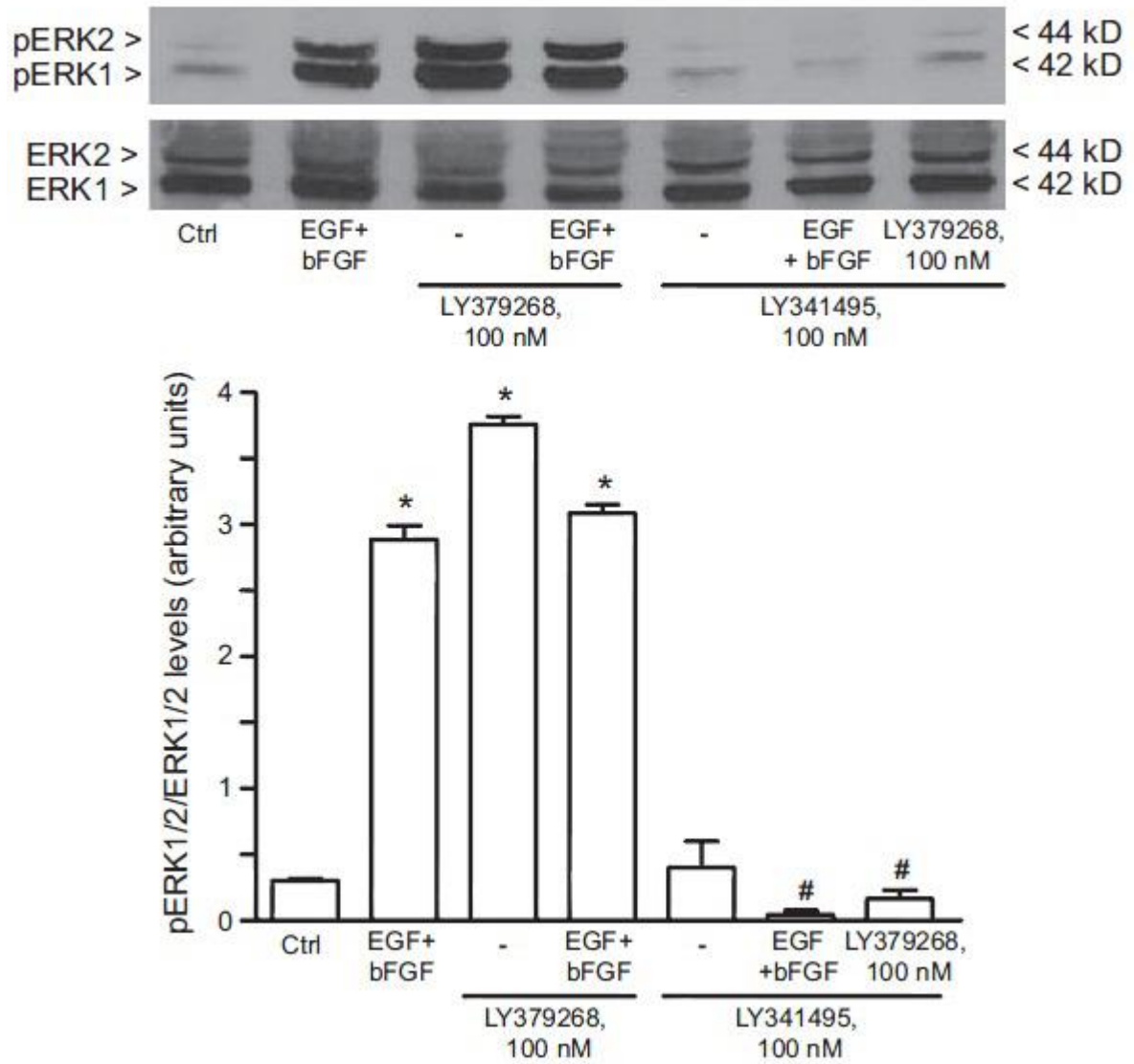
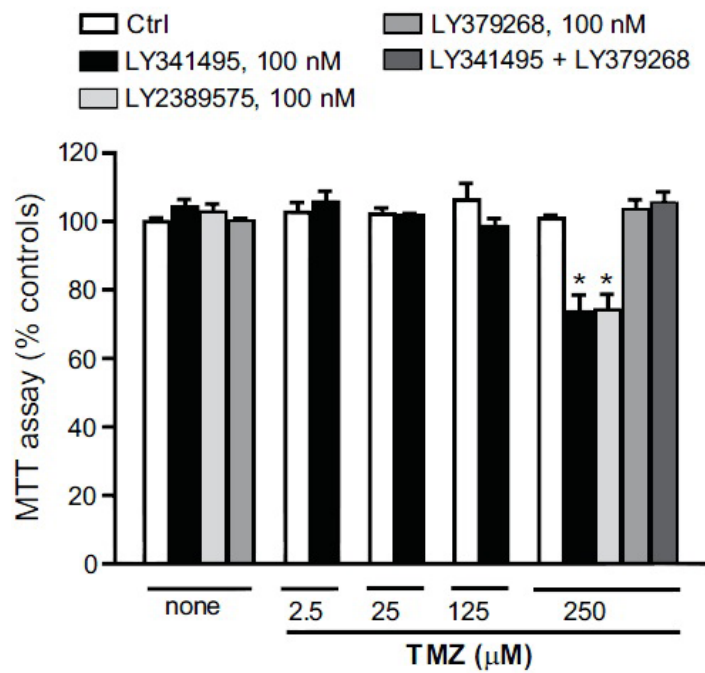


Figura 6.5: Attivazione da parte del recettore mGlu3, della via delle MAP kinasi in presenza del suo agonista farmacologico LY379268.

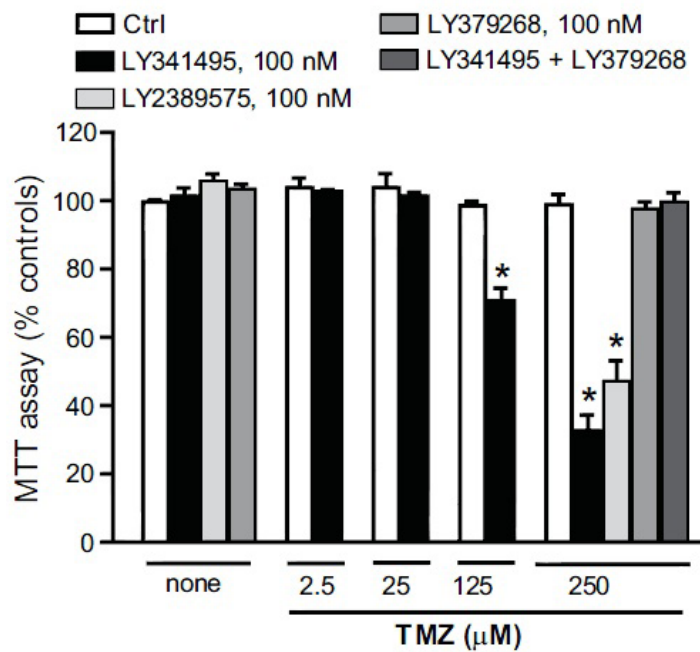
Interazione tra la modulazione farmacologica del mGluR3 e la resistenza delle cellule staminali di GBM ai chemioterapici:

Per stabilire se la modulazione farmacologica del recettore mGluR3 abbia effetti sulla resistenza delle cellule staminali tumorali di glioblastoma ai farmaci citotossici, quale la Temozolomide, è stato somministrato, in un'unica somministrazione, il farmaco e/o l'antagonista (LY341495), su cellule indifferenziate, coltivate in un mezzo privo di siero e addizionato con mitogeni.

Gli effetti sulla sopravvivenza cellulare sono stati osservati dopo 24h e 48h dal trattamento. Il trattamento farmacologico con l' LY341495, antagonista del mGluR2/3, da solo, si dimostra inefficace nel ridurre la sopravvivenza cellulare, così come per la Temozolomide. La combinazione dell'antagonista e dell'agente alchilante determina, invece, un significativo aumento di morte cellulare. La Temozolomide è stata somministrata a diverse concentrazioni, in un range ampio, tra 2,5 μM e i 250 μM e nessun dosaggio si è rivelato in grado di ridurre la sopravvivenza cellulare quando il farmaco veniva somministrato da solo (fig.6.6). La stessa cosa vale per l'LY341495 che invece è stato somministrato ad una concentrazione costante pari a 100nM (concentrazione non tossica, utilizzata già in diversi lavori del nostro gruppo di ricerca: Ciceroni et al. 2008, Ciceroni et al 2010). Tali risultati indicano che il blocco farmacologico del signalling del recettore mGluR3 aumenta sensibilmente l'effetto citotossico della Temozolomide in tutte le linee cellulari (fig.6.7). Gli stessi risultati sono stati ottenuti procedendo in modo leggermente diverso: le cellule sono state trasfettate con dei siRNA per il gene del mGluR3 che, in questo modo, non viene tradotto ed espresso a livello proteico dalle cellule. La conferma dell'avvenuto silenziamento è stata ottenuta tramite l'analisi western blot, da cui risulta una riduzione di circa 80% dell' espressione del recettore sia dopo 24 che dopo 48 ore dalla reazione di silenziamento (fig.6.8). Dopo il silenziamento si è proceduto alla somministrazione della Temozolomide con risultati che confermano quelli ottenuti con l'esperimento precedente: il silenziamento del recettore mGluR3 così come il suo blocco farmacologico, potenziano l'azione citotossica dell'agente alchilante. Infine l'aggiunta del LY341495 non amplifica l'azione citotossica della Temozolomide quando aggiunto alle cellule trattate con uno o con l'altro siRNA, dimostrando come sia proprio la modulazione del recettore mGluR3 a rendere le cellule sensibili al farmaco (fig.6.9).



24 hours



48 hours

Figura 6.6: Tossicità a 24 e 48 ore della TMZ somministrata da sola o in combinazione LY341495/LY2389575, antagonisti del recettore mGlu3, sul clone E. L'effetto citotossico maggiore si osserva a concentrazioni di Temozolomide pari a 250mM in combinazione con LY341495.

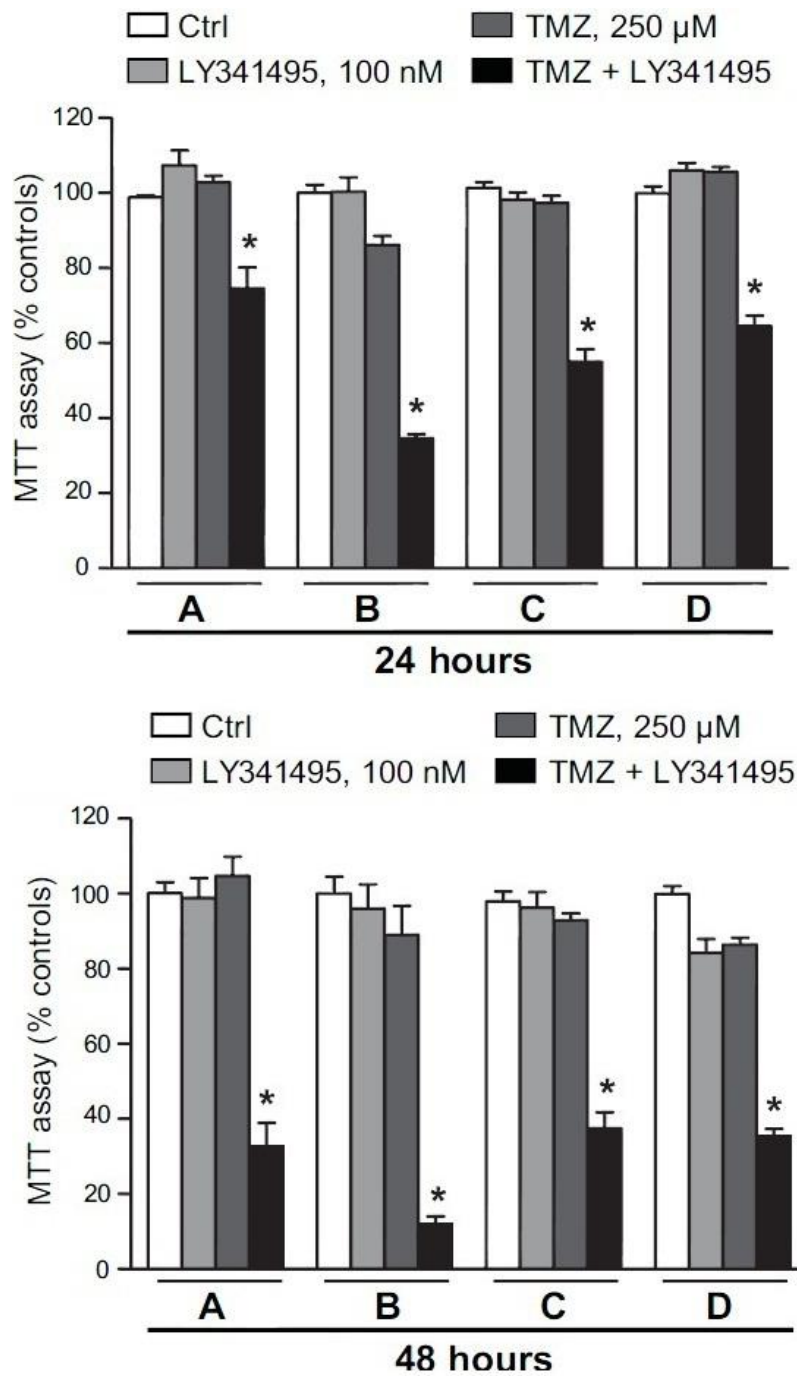


Figura 6.7: Tossicità della TMZ somministrata da sola o in combinazione LY341495 sul clone A, B, C e D. La sopravvivenza cellulare è stata valutata a diversi intervalli di tempo (8□12□24 e 48 ore) con concentrazioni di Temozolomide pari a 250mM. L'effetto citotossico maggiore si osserva a 24 e 48 ore con il trattamento combinato.

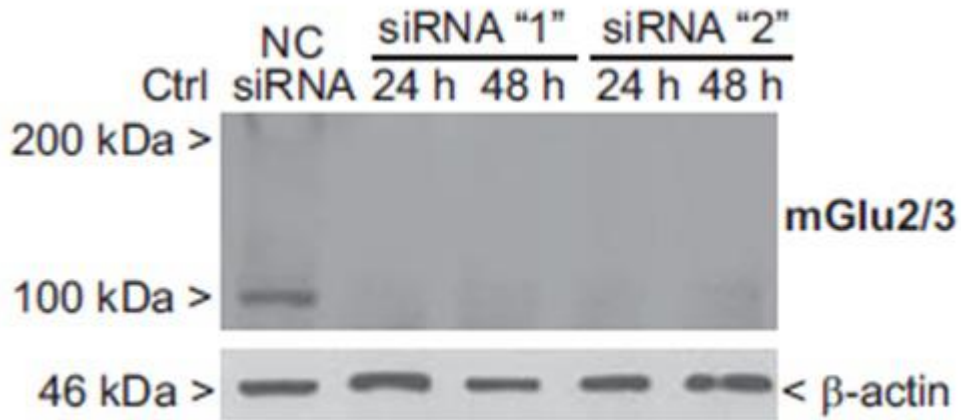


Figura 6.8: L' assenza di prodotto di PCR conferma l'avvenuto silenziamento con entrambi i siRNA del mRNA codificante per mGluR3. I valori espressi sono la media + ds di 6 dish in coltura di tre esperimenti indipendenti. $P < 0.05$ sui rispettivi controlli (One Way ANOVA + Test di Fisher LSD).

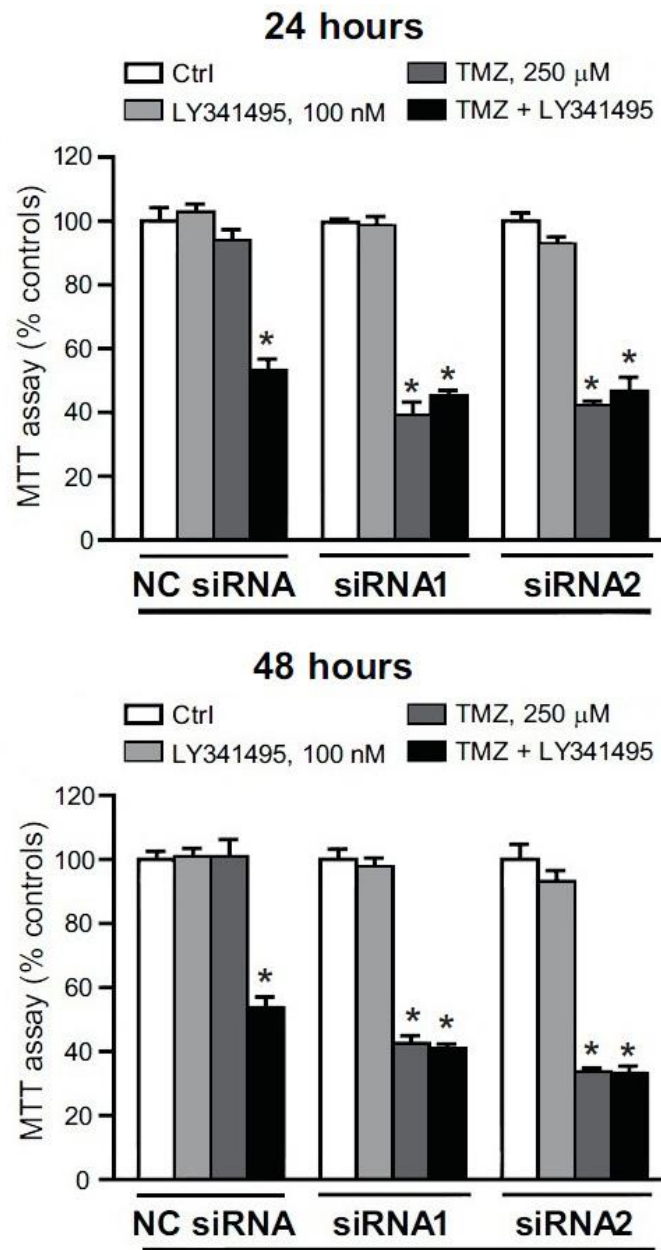


Figura 6.9: Effetti del silenziamento del recettore mGlu3 sulla tossicit  della TMZ in GSCs a 24 e a 48 ore. Dai saggi MTT si osserva che la TMZ diviene tossica solo in GSCs trasfettate con i siRNA ma non in cellule trasfettate con NC siRNA (non-coding siRNA)

Il blocco farmacologico del mGluR3 influenza la resistenza alla Temozolomide attraverso la pathway della PI3K:

Dimostrato che la modulazione del mGluR3 interferisce con la resistenza delle cellule staminali tumorali alla Temozolomide, è stato indagato quale fosse tra i tre diversi pathway che possono essere attivati/inibiti dall'attivazione del mGluR3, quello responsabile di tale fenomeno.

1. Il trattamento con 8-Br-cAMP, analogo permeabile dell'AMPc, sia da solo che in combinazione con la Temozolomide, non mostra effetti sulla sopravvivenza cellulare, escludendo così il ruolo del cAMP, nel meccanismo di resistenza.
2. Il trattamento con UO126, inibitore delle MAP chinasi, non comporta una significativa riduzione della vitalità cellulare, in combinazione con la Temozolomide.
3. Il trattamento con LY294002, inibitore della PI3K, mostra un effetto simile a quello del LY341495 e del blocco del mGluR3, sulla vitalità cellulare in combinazione con la Temozolomide (fig.6.10).

Questo dimostra che, l'interazione tra il recettore metabotropico sottotipo 3 del glutammato e la resistenza agli agenti alchilanti, passa attraverso l'inibizione della pathway della PI3K. Per confermare ulteriormente il coinvolgimento della PI3K, le cellule staminali di GBM sono state trasfettate con un plasmide contenente una forma costitutivamente attiva di Akt (caAkt), una chinasi che si trova direttamente a valle della via della PI3K. Le cellule trasfettate sono state trattate con LY341495 e/o con Temozolomide e i risultati sono stati confrontati con quelli derivati da cellule non trasfettate ma sottoposte allo stesso trattamento. Nei controlli (cellule non trasfettate) la combinazione di LY341495 e Temozolomide determina una sensibile riduzione della vitalità cellulare. Nelle cellule trasfettate con la forma costitutivamente attiva di Akt, la combinazione dei due farmaci non influisce sulla vitalità cellulare a 24 ore, mentre risulta lievemente tossica a 48 ore (fig. 6.11). Tra le diverse proteine effettrici che fanno parte della pathway di Akt c'è anche il fattore

nucleare κ B (NF κ B). Akt fosforila I κ B attivando così NF κ B che limita l'attività pro-apoptica degli agenti alchilanti. Per confermare il coinvolgimento di NF κ B nel signaling a valle di AKT è stata valutata la vitalità cellulare attraverso l'uso del MTT utilizzando JSH-23, inibitore di NF κ B. Il JSH-23, alla concentrazione di 10 μ M, rende la popolazione di cellule staminali tumorali di GBM sensibile all'azione citotossica della Temozolomide in maniera analoga all'inibitore del mGluR3 LY341495 (fig.6.12). Al contrario di LY341495, JSH-23 è in grado di aumentare l'effetto citotossico della Temozolomide in cellule di GBM che esprimono la forma costitutivamente attiva di AKT, indicando che NF κ B si trova a valle del pathway di segnale di AKT (fig. 6.13). Le β -catenine, coinvolte nel prevenire la morte per apoptosi p53-dipendente, sono sotto il controllo del pathway cellulare PI3K-AKT in quanto AKT inibendo la glicogeno sintasi chinasi3 (GSK3) previene la loro degradazione. Per dimostrare l'implicazione delle β -catenine nella proliferazione e nella resistenza, le cellule staminali tumorali CD133+ sono state trasfettate con un vettore codificante per una forma mutata delle β -catenine resistente alla fosforilazione. E' risultato che le cellule di GBM, che esprimevano la forma proteica mutata, erano in grado di sopravvivere in seguito al trattamento combinato della Temozolomide con LY341495, riuscendo a bloccare, in tal modo, il sinergismo mediato dai due farmaci (fig. 6.14). Questo sinergismo, inoltre, era perso in cellule di GBM trattate con il litio che agisce da inibitore non selettivo della GSK3 (fig. 6.15). Nel loro insieme questi dati indicano che la perdita della resistenza alla temozolamide, osservata in cellule staminali tumorali di GBM, ottenuta con l'utilizzo di inibitori del recettore mGlu3, è da attribuire alla mancata attivazione della PI3K che causa da una parte la perdita dell'attività trascrizionale di NF κ B e, dall'altra, la degradazione delle β -catenine per opera di GSK3 (fig. 6.16).

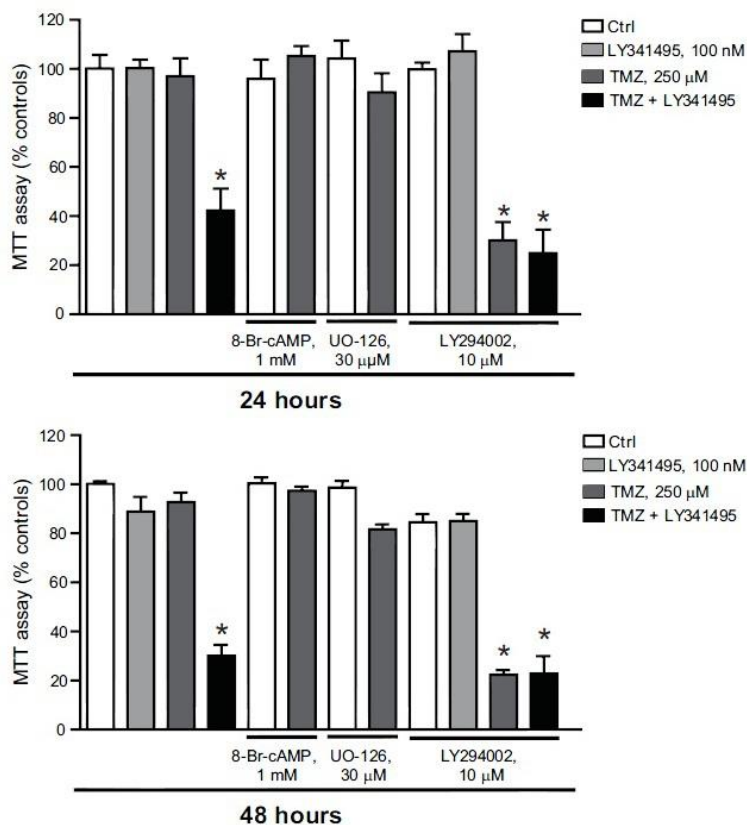


Figura 6.10: Tentativo di individuare quale tra le tre principali vie modulate dal mGluR3 è coinvolto nella chemioresistenza agli agenti alchilanti osservata in GSCs. Sono stati somministrati, l' 8-Br-cAMP, analogo dell' AMP ciclico, l' UO126, inibitore delle MAP kinasi e LY294002, inibitore della PI3K. Le cellule sono state trattate con i singoli farmaci e con la combinazione di essi con la Temozolomide. Solo la Temozolomide, in combinazione con LY294002, riduce sensibilmente la vitalità cellulare, anche in presenza del LY341495, dimostrando che la via, attraverso cui il recettore mGluR3 influenza la chemioresistenza è quella della PI3K.

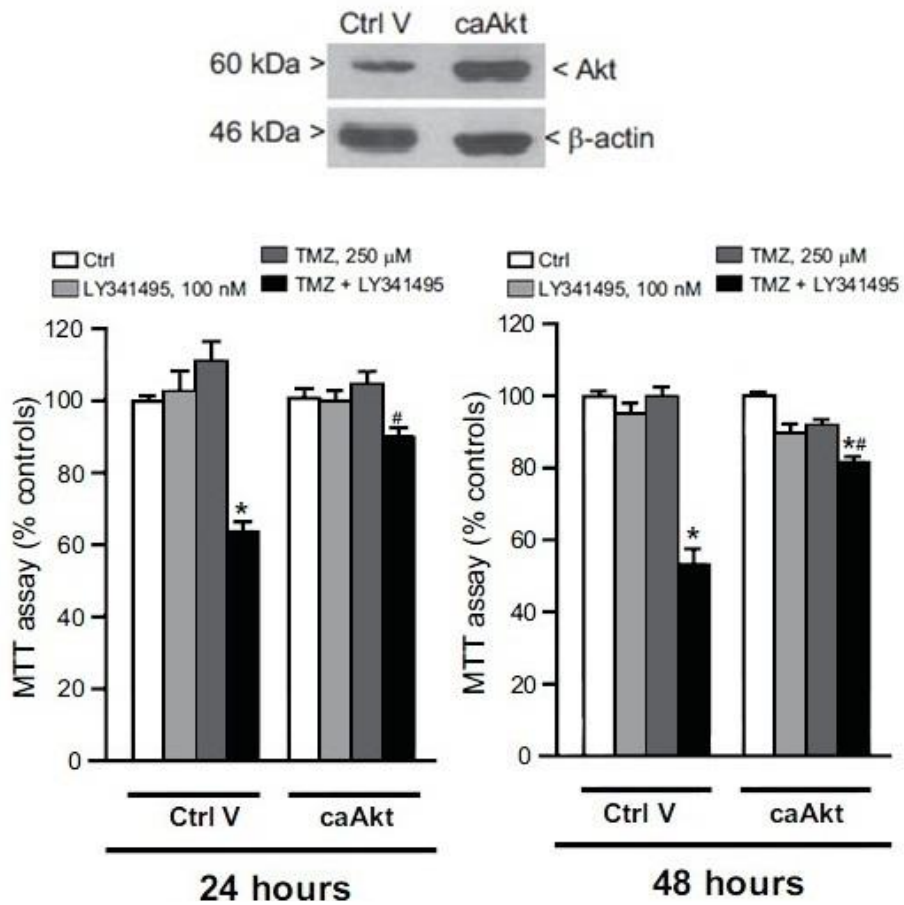


Figura 6.11: La trasfezione con Akt costitutivamente attiva riduce notevolmente l'effetto citotossico della Temozolomide in combinazione con 1 LY341495 sia a 24 che a 48 ore. I valori espressi sono la media + ds di 6 dish in coltura di tre esperimenti indipendenti. $P < 0.05$ sui rispettivi controlli (One Way ANOVA + Test di Fisher LSD).

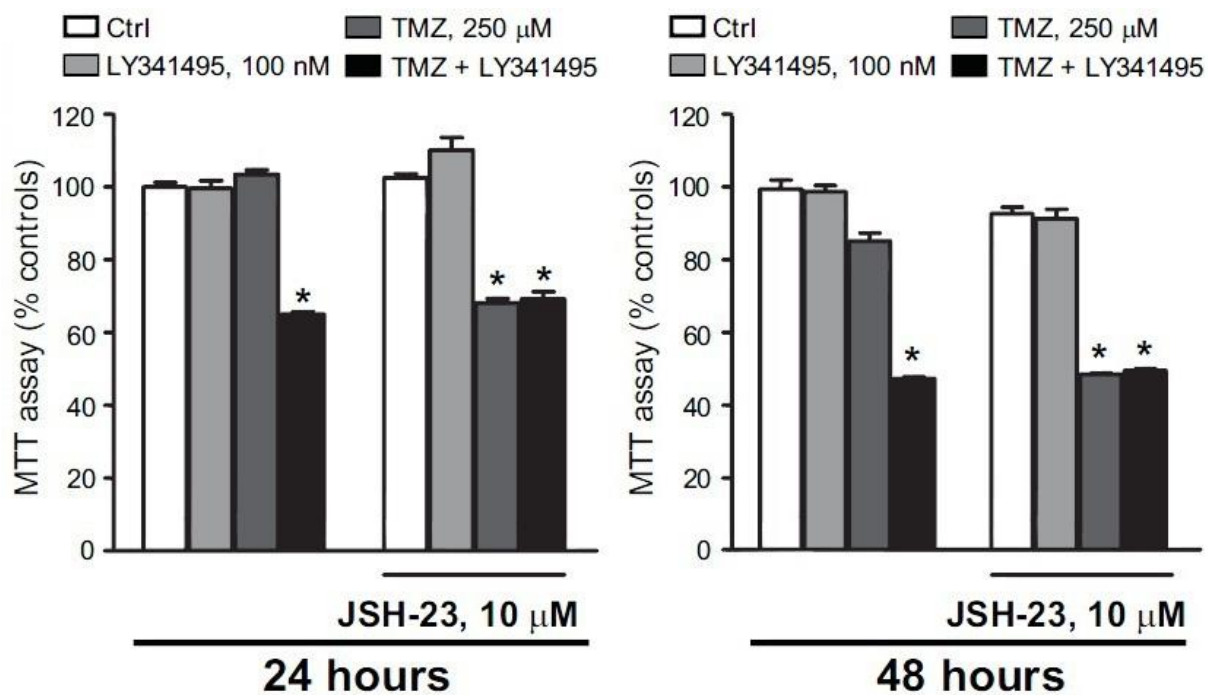


Figura 6.12: Effetto della somministrazione di JSH-23, inibitore di NFκB, sulla sopravvivenza cellulare. Come si può notare dai saggi MTT a 24 e 48h JSH-23, alla concentrazione di 10 μM, riduce la sopravvivenza cellulare sia in seguito alla sola somministrazione di Temozolomide che combinato con LY341495.

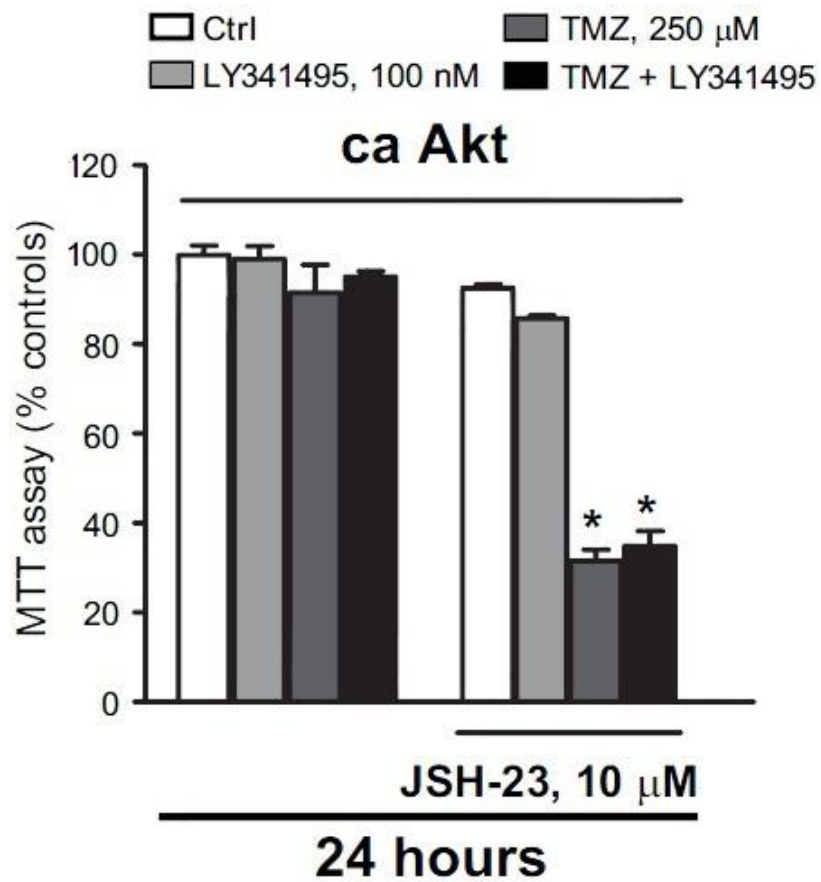


Figura 6.13: Effetto della somministrazione di JSH-23 in cellule che esprimono la forma costitutivamente attiva di AKT. L'inibitore di NF κ B, a 24h, riduce la sopravvivenza in cellule sia trattate con Temozolomide che con Temozolomide+LY341495 confermando il coinvolgimento di NF κ B nel pathway a valle di AKT responsabile nel frenare l'effetto citotossico dell'agente alchilante Temozolomide in cellule di GBM.

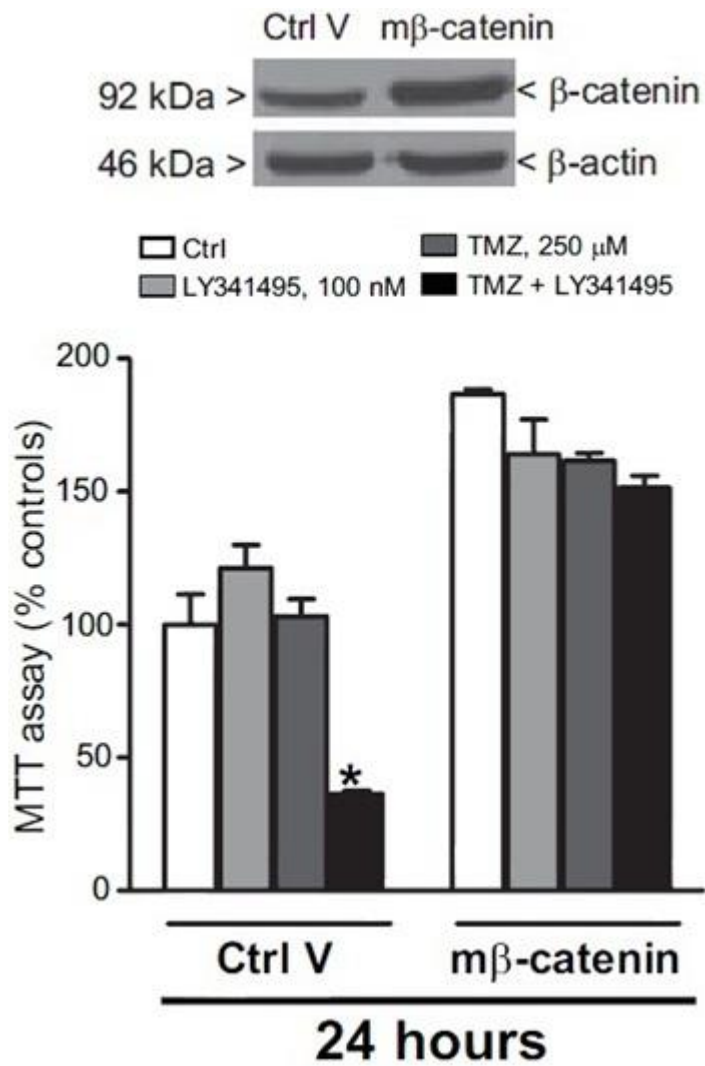


Figura 6.14: GSCs trasfettate con la forma mutata delle β -catenine, resistente alla fosforilazione, mostrano al saggio MTT a 24h un aumento della sopravvivenza dopo trattamento con Temozolomide e combinato con LY341495 rispetto a cellule trasfettate con Ctrl V (control vector V).

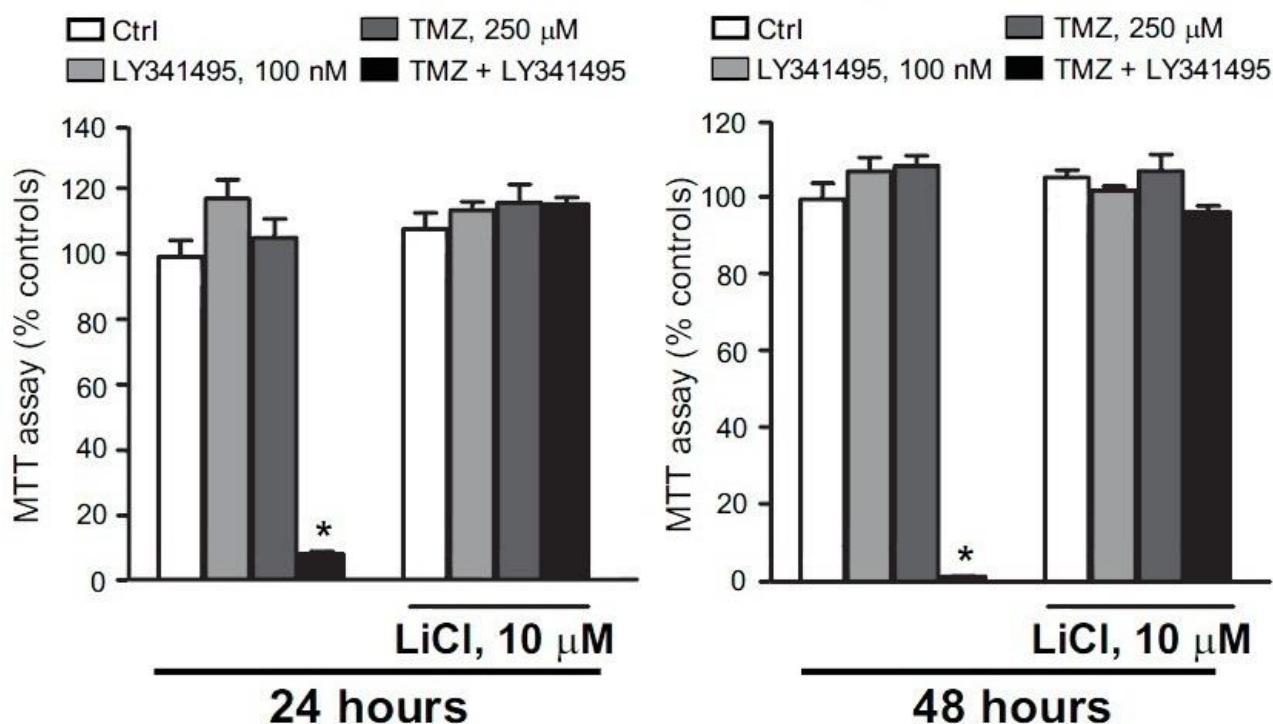


Figura 6.15: Saggio MTT dopo trattamento con litio, inibitore non selettivo della GSK3, alla concentrazione di $10 \mu\text{M}$ a 24h e 48h. Il blocco dell'enzima elimina l'effetto citotossico della Temozolomide in combinazione con LY341495 dimostrando che non solo l'attivazione di NF κ B ma anche l'attivazione delle β -catenine, a valle del pathway di signaling cellulare, è responsabile dell'aumento della sopravvivenza cellulare dopo trattamento con agenti alchilanti.

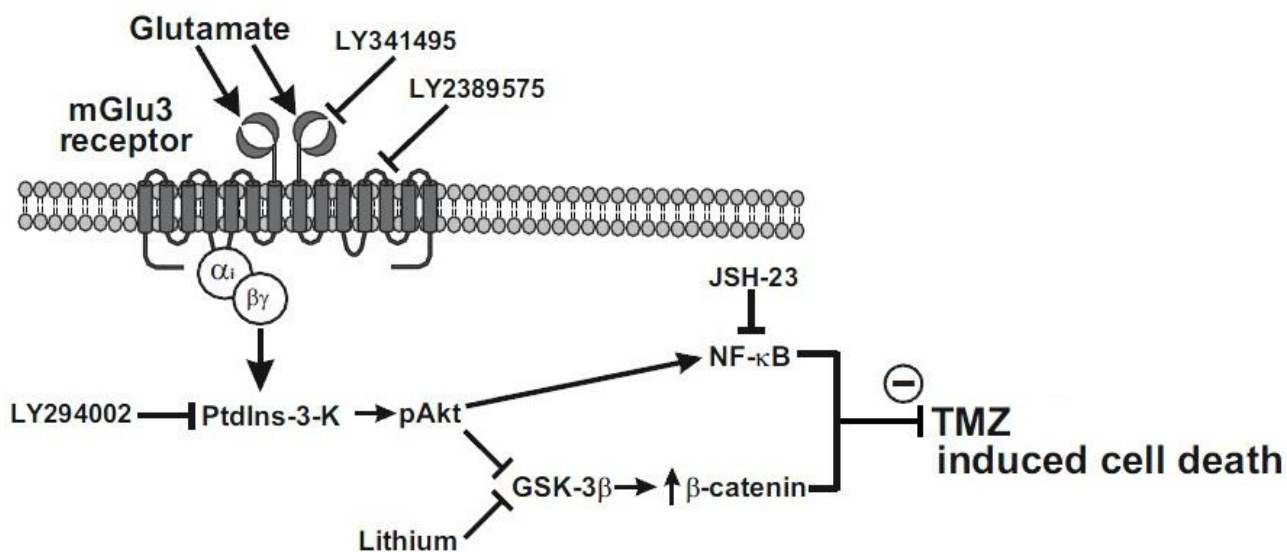


Figura 6.16: Pathway cellulare a valle del recettore mGlu3 coinvolto nella sopravvivenza e resistenza delle cellule di GBM alla Temozolomide.

Influenza del blocco farmacologico del mGluR3 e della Temozolomide sull'espressione del MGMT (O6-methylguanine-DNA-methyltransferase):

Dato che la citotossicità della TMZ è fortemente influenzata dai livelli enzimatici della MGMT, esiste difatti una correlazione inversa tra la sensibilità alla TMZ e i livelli di MGMT, riteniamo che la resistenza alla Temozolomide osservata nel GBM sia da correlare alla percentuale di cellule CD133+ presenti nella massa tumorale in quanto queste presentano elevati livelli di mRNA codificante per MGMT. Attraverso analisi di western blot è stata confermata l'elevata espressione del MGMT in tutte e 5 le linee cellulari CD133+ rispetto a cellule staminali non tumorali. Lo stesso tipo di analisi è stata eseguita anche su cellule trattate con la Temozolomide e/o LY341495.

Soltanto le cellule trattate, sia con l'antagonista del recettore mGlu3 che con l'agente alchilante, mostrano una riduzione nell'espressione della MGMT, sia a 24 che a 48 ore dal trattamento, mentre a 8 e a 12 ore non si riscontrano variazioni, nella vitalità cellulare, così come nelle cellule trattate solo con Temozolomide o solo con LY341495 (fig. 6.17). La riduzione dei livelli di MGMT nelle cellule trattate solo con TMZ osservato tra le 24 e le 48 ore è da associare alla perdita di proteine di riparo del DNA le quali causano una riduzione dell'espressione dell'enzima. La riduzione dell'espressione della proteina MGMT è stata osservata sia tramite PCR (fig.6.18), sia tramite silenziamento del recettore mGlu3 e successivo trattamento delle cellule con la Temozolomide (fig.6.19). In presenza del LY341495 i livelli di trascrizione del gene di MGMT rimangono uguali alle cellule non trattate mentre è possibile osservare un aumento della sua sintesi in seguito alla somministrazione di Temozolomide (che danneggiando il DNA induce l'espressione dell'enzima di riparazione). L' LY341495, in combinazione con la Temozolomide, riduce i livelli di trascrizione del gene riportandoli a livelli comparabili, anche se ancora elevati, con i livelli del controllo e delle cellule trattate solo con LY341495. Gli stessi risultati sono ottenuti in cellule trattate con LY294002

(inibitore PI3K) o con JSH-23 (inibitore NFκB). Questi trattamenti vanno, infatti, a simulare l'azione di LY341495 sul mGluR3 (fig. 6.20). Ci siamo chiesti: perché nel trattamento combinato si osserva una riduzione dei livelli di MGMT se al contrario la Temozolomide, danneggiando il DNA, dovrebbe indurre un suo aumento? Per rispondere abbiamo indagato quale fosse il legame tra il blocco di NFκB, ultimo protagonista del pathway del mGluR 3, e la riduzione dell'espressione di MGMT. Avvalendoci dell'immunoprecipitazione della cromatina (ChiP), abbiamo osservato che la regione promotrice del gene MGMT contiene due siti di legame per NFκB ed in seguito all'attivazione di quest'ultimo, da parte di AKT, si ha un aumento dei livelli di espressione dell'enzima e in tal modo della chemioresistenza delle cellule di GBM. Come si può notare dagli studi della ChiP, il trattamento, per circa 2 ore, con Temozolomide aumenta il legame di NFκB sui due elementi responsivi presenti sul promotore del gene MGMT di circa 4/5 volte. Questo effetto, invece, è annullato in seguito a trattamento con l'antagonista del recettore mGlu3, l'LY341495 dimostrando che l'attivazione dell'enzima MGMT è mediata proprio dal fattore trascrizionale NFκB (fig. 6.21). Il mancato aumento della citotossicità alla Temozolomide dopo cosomministrazione o con LY341495, o con LY294002 o con JSH-23 in cellule staminali tumorali di GBM che overesprimono MGMT,(fig. 6.22), dimostra che il sinergismo tra il blocco del recettore mGlu3 e l'azione della Temozolomide è mediata dall'inibizione dell'espressione di MGMT.

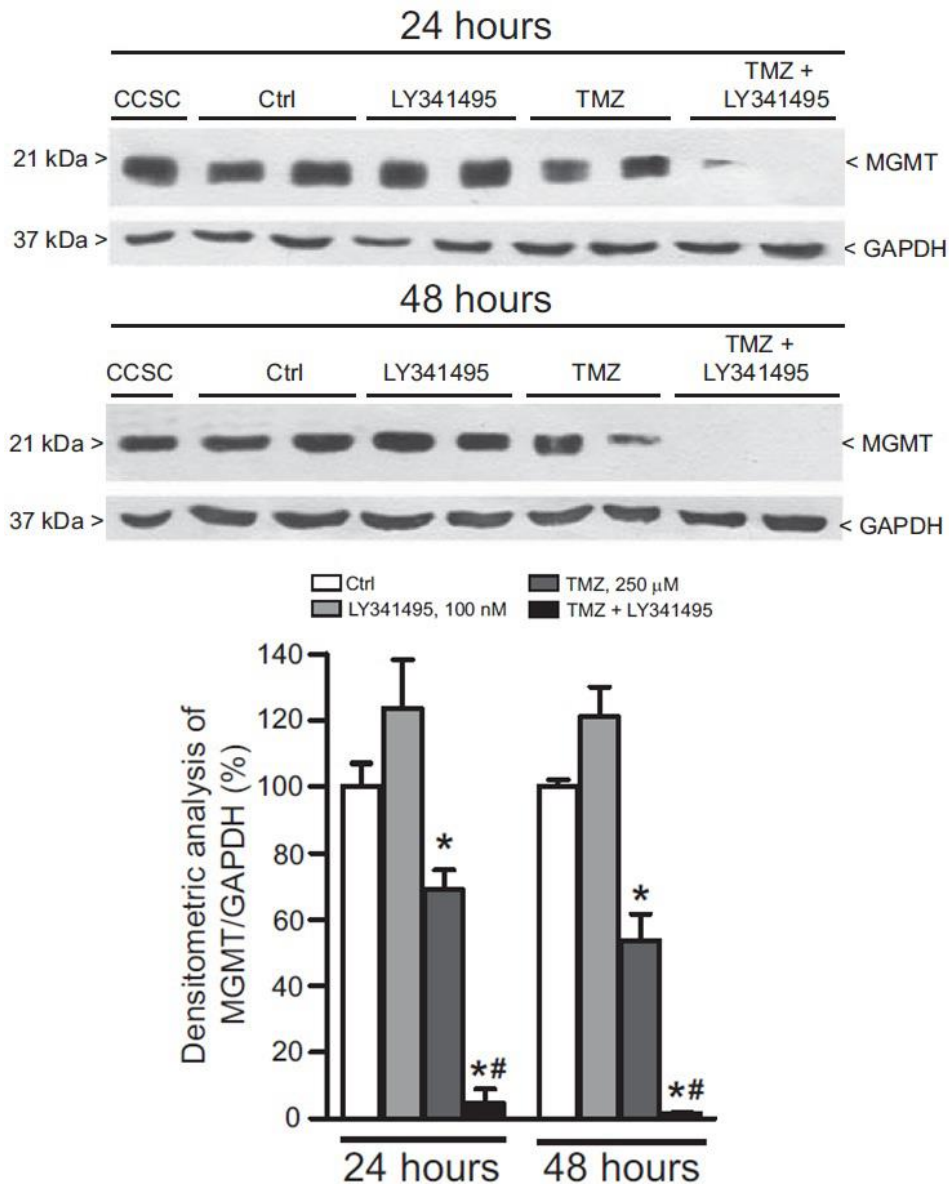


Figura 6.17: Western Blot che mostra la quantità di MGMT espressa dalle cellule in presenza della Temozolomide, del LY341495 e di entrambi i farmaci. In accordo con i dati ottenuti fin ora, i livelli di proteina si abbassano in presenza della combinazione dell'antagonista glutamatergico e dell'agente alchilante. Cellule staminali tumorali del colon (CCSCs) sono state utilizzate come controlli positivi per l'espressione di MGMT. I valori ottenuti dalla densitometria sono espressi come la media S.E.M. di 3 determinazioni. $p < 0; 05$ vs Ctrl o LY341495 da solo, o vs Temozolomide (TMZ) da solo (1) (One-way ANOVA + Tukey s t-test).

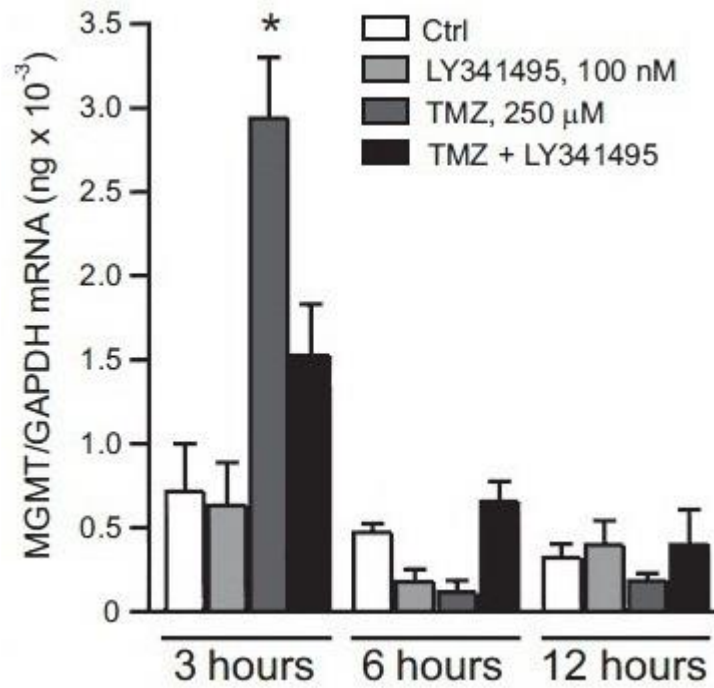


Figura 6.18: Analisi di Real Time PCR a 3 diversi tempi (3; 6; 12 ore) di GSCs trattate con LY341495 e/o Temozolomide (TMZ) mostra una variazione, a livello trascrizionale, del gene del MGMT. Come si può notare si ha un notevole aumento del trascritto nelle prime 3 ore dopo la somministrazione della Temozolomide, mentre dopo 6 e 12 ore dalla somministrazione, la quantità di trascritto torna ai livelli basali. I valori sono espressi come la media S.E.M. di 3 determinazioni. $P < 0:05$ vs controlli (Ctrl) (One-way ANOVA + Tukey s t-test).

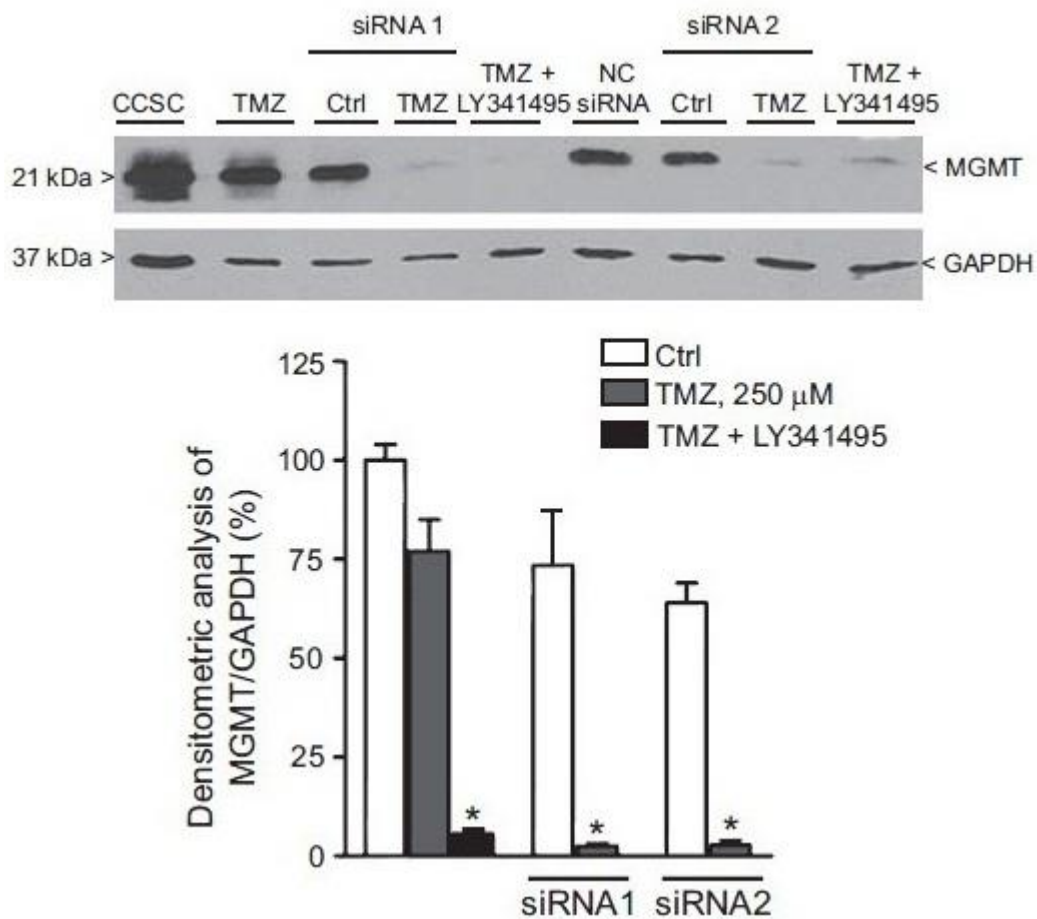


Figura 6.19: Variazione dei livelli di MGMT in cellule che hanno subito il silenziamento del recettore mGluR3. Come si può notare, il trattamento con la Temozolomide riduce i livelli di enzima rispetto ai controlli, riproducendo i dati ottenuti nelle cellule non trasfettate con i siRNA e trattate con LY341495 e Temozolomide. I valori sono espressi come la media + S.E.M. di 3 determinazioni. $P < 0.05$ vs Ctrl (One-way ANOVA + Tukey's t-test).

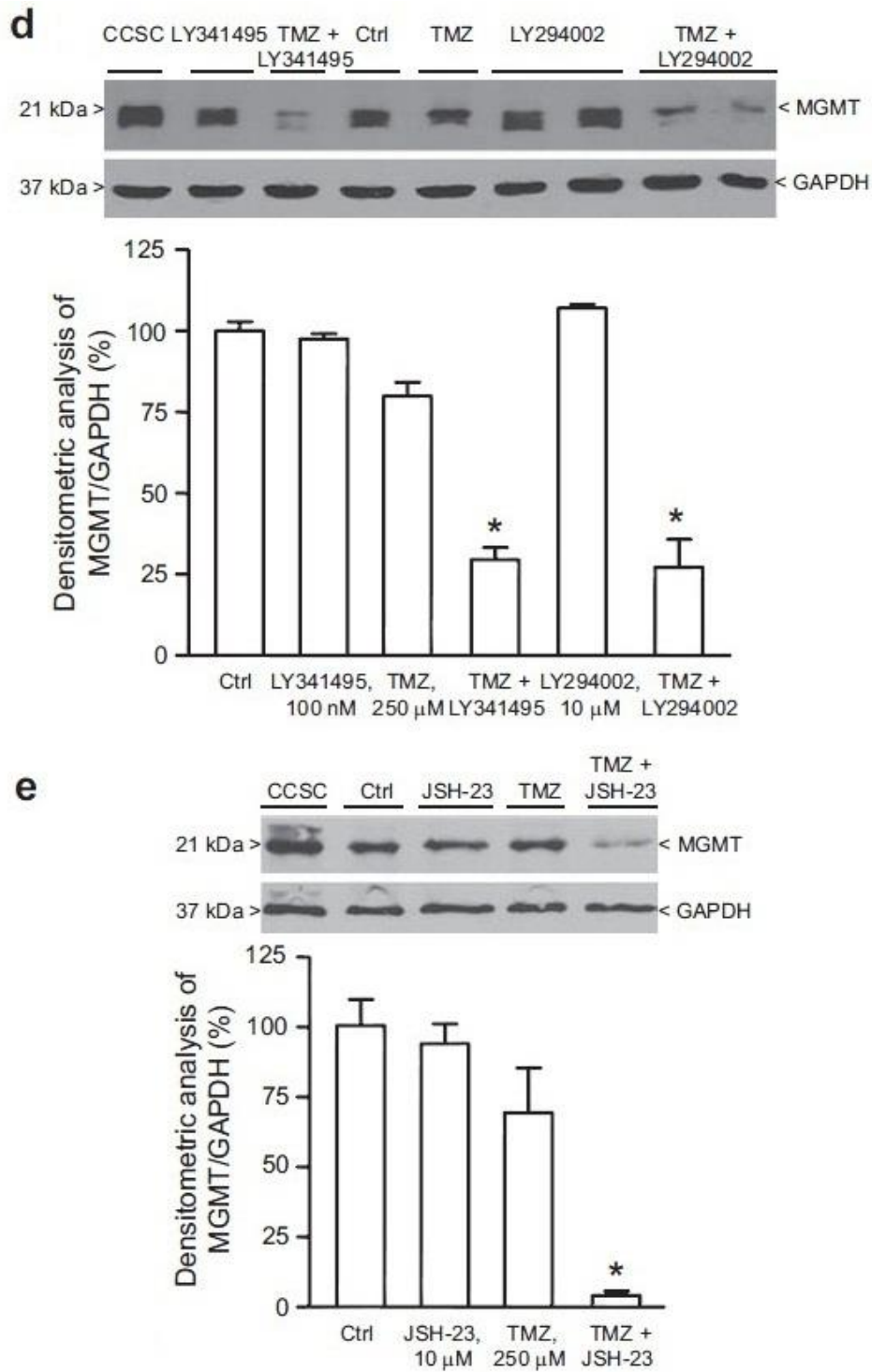


Figura 6.20: Le figure D ed E mostrano la variazione dei livelli di MGMT in cellule trattate rispettivamente con LY294002 (inibitore della PI3K) e JSH-23 (Inibitore di NFκB). I valori sono espressi come la media + S.E.M. di 3-6 determinazioni. $P < 0:05$ vs Ctrl (One-way ANOVA + Tukey's t-test).

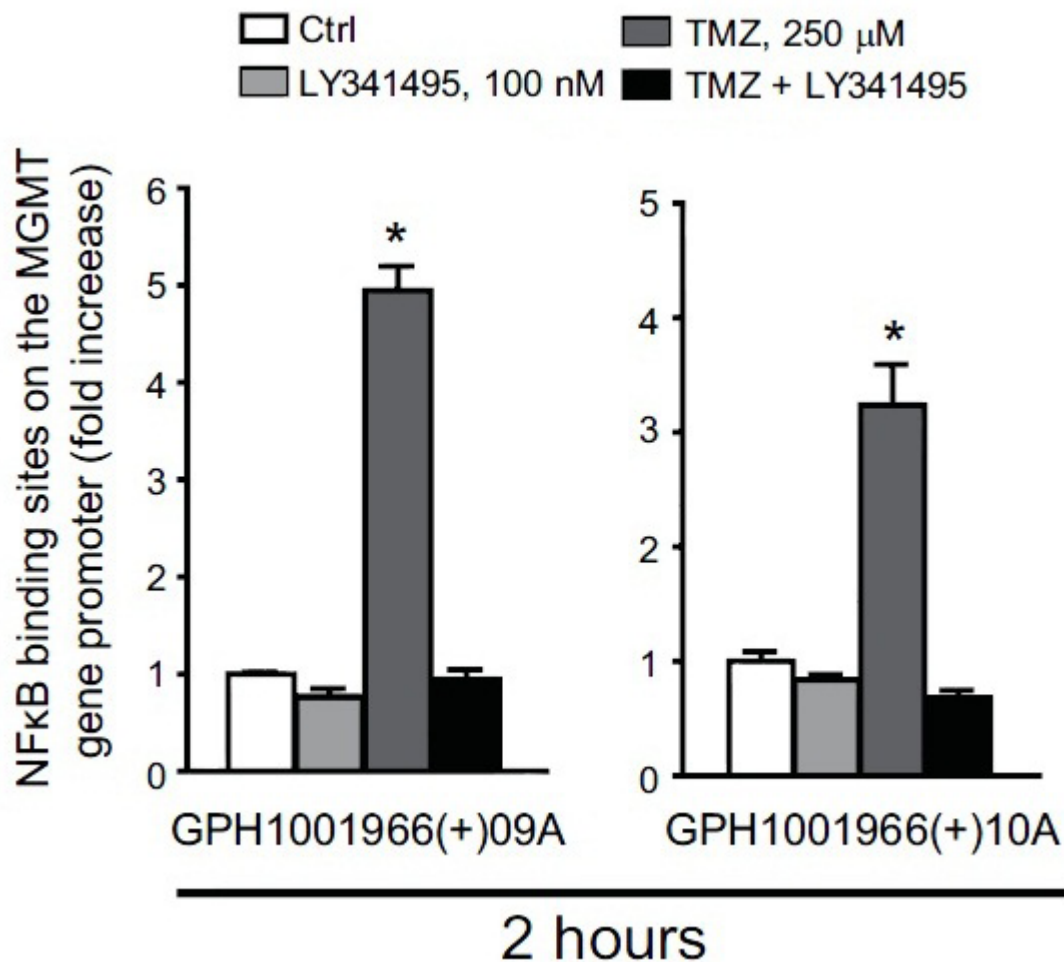


Figura 6.21: Risultati ottenuti dopo immunoprecipitazione effettuata per confermare l'attivazione diretta di MGMT da parte di NF κ B. Cellule di GBM trattate con Temozolomide, alla concentrazione di 250 μ M, per circa 2h, presentano un aumento dei livelli trascrizionali di MGMT grazie al legame di NF κ B in due siti presenti sulla regione promotrice del gene. Al contrario questo effetto è abolito dopo trattamento con LY341495 o con i due farmaci combinati. Ciò conferma che, non solo, è NF κ B ad attivare direttamente MGMT ma che è proprio il pathway PI3K-AKT-NF κ B, attivato in seguito alla stimolazione del mGluR3, responsabile della resistenza delle cellule di GBM alla Temozolomide. I valori sono espressi come la media \pm S.E.M. di 9 misurazioni diverse da 3 esperimenti di ChIP indipendenti. $P < 0.05$ vs tutti gli altri valori (One-way ANOVA + test Tukey st).

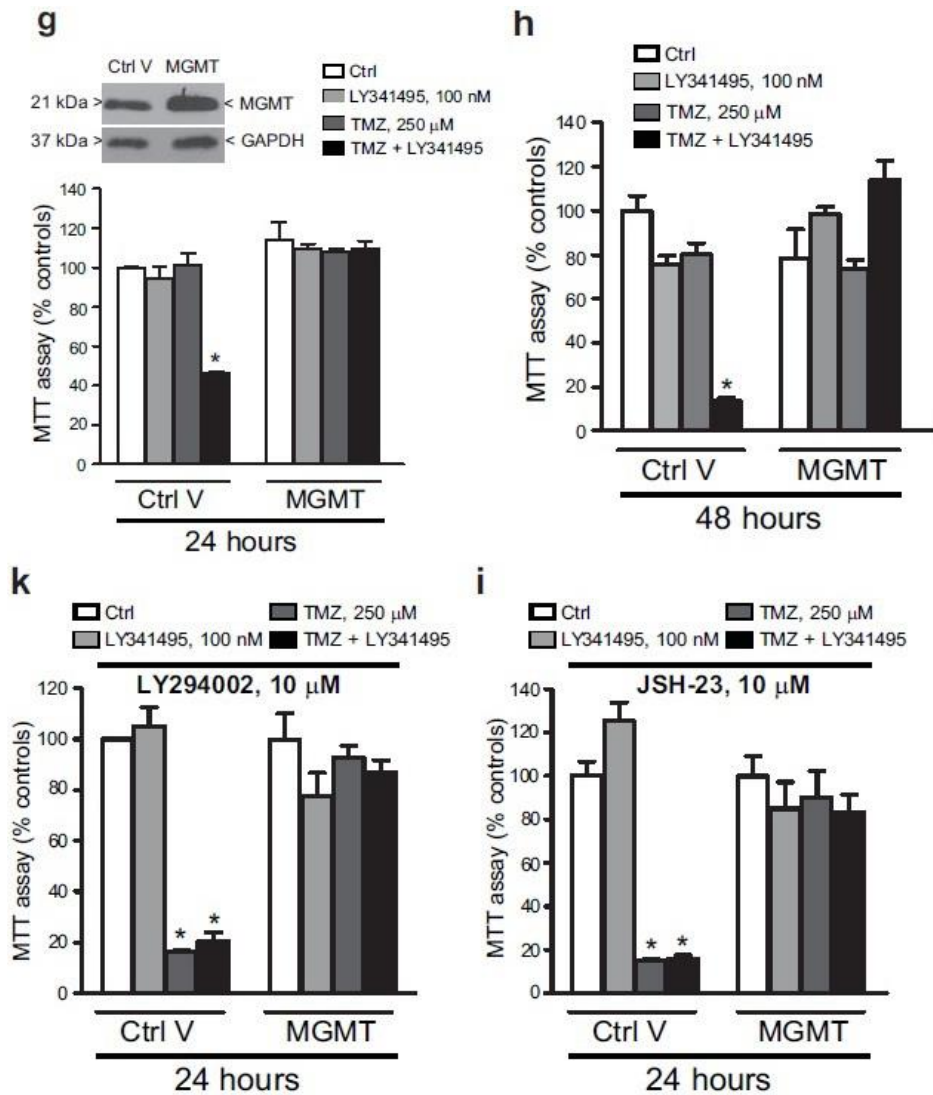


Figura 6.22: Le figure G ed H mostrano due saggi MTT, a 24h e 48h, effettuato su cellule che overesprimono l'enzima MGMT, come si può osservare dal western blot, rispetto a cellule controllo. GSCs che overesprimono MGMT anche se trattate con la Temozolomide o con il combinato mostrano una sopravvivenza maggiore rispetto al controllo. La figura K mostra un saggio MTT in cui sia il controllo che GSCs che overesprimono l'enzima MGMT sono trattati a 24h con l' LY294002, un modulatore allosterico negativo del mGluR3, alla concentrazione di 10 μ M, in associazione alla Temozolomide e al combinato. Cellule che overesprimono MGMT mostrano una maggiore sopravvivenza cellulare rispetto al controllo. La figura I mostra un saggio MTT in cui sia il controllo che GSCs che overesprimono MGMT sono trattate per 24h con il JSH-23, inibitore del fattore trascrizionale NF κ B. Cellule che overesprimono MGMT hanno una maggiore sopravvivenza rispetto alle cellule controllo. Questi dati dimostrano che il meccanismo di resistenza agli agenti alchilanti è mediato proprio dal pathway cellulare che porta all'attivazione dell'MGMT. I valori sono espressi come la media \pm S.E.M. di 8 \pm 12 determinazioni \times 3 esperimenti indipendenti. $P < 0.05$ vs Ctrl (One-way ANOVA + test Tukey st).

Il Trattamento combinato LY341495 e Temozolomide inibisce la crescita tumorale di CSCs impiantate nello striato di topi nudi CD1:

Per consolidare i risultati ottenuti in vitro, sono state impiantate GSCs umane ingegnerizzate, in modo da esprimere la proteina fluorescente verde (GFP), nel nucleo caudato sinistro di topi nudi CD1 (5×10^5 cellule / 5microlitri / 5min). Abbiamo effettuato due serie di esperimenti con quattro gruppi di 10 topi ciascuno. Tutti i topi sono stati sottoposti ad infusione stereotassica delle GSCs GFP+ e trattati con LY341495(3mg/kg/die per 28 giorni) o soluzione salina somministrati per via sottocutanea attraverso l'uso di minipompe osmotiche. Contemporaneamente, i topi hanno ricevuto, a giorni alterni, tre iniezioni o di temozolomide (70mg/kg,i.p.) o di soluzione salina durante la prima settimana dopo l'impianto. Nella prima serie di esperimenti i topi sono stati trattati 15 giorni dopo dalla data dell'impianto e sono stati sacrificati a 45 giorni dallo stesso (fig.6.23).

Nella seconda serie di esperimenti i topi sono stati trattati 45 giorni dopo l'impianto e sono stati sacrificati a 75 giorni dallo stesso (fig.6.24). Topi di controllo, cioè topi che dopo l'impianto cellulare hanno ricevuto solamente la soluzione salina, mostrano attraverso l'analisi istologica la presenza di cellule GFP+ con morfologia tipica delle cellule di glioma. Nei topi sacrificati a 45 giorni dall'impianto l'analisi istologica mostra che le cellule tumorali sono confinate a livello della porzione mediale del nucleo caudato vicino alla parete del ventricolo laterale (fig.6.23). Nei topi sacrificati a 75 giorni, l'analisi istologica mostra che le cellule tumorali formano una massa infiltrante nel nucleo caudato ipsilaterale che si diffonde, nella maggior parte degli animali, nella parte controlaterale del corpo calloso (fig.6.24). In queste condizioni la somministrazione di LY341495 o di temozolomide, non è stata capace di avere effetti significativi sulla crescita del tumore indicando che tali agenti risultano inefficaci se somministrati singolarmente. Al contrario, un trattamento combinato di temozolomide e LY341495 riduce significativamente la crescita tumorale (fig.6.23) (fig.6.24),in accordo con i dati ottenuti in vitro. Vogliamo sottolineare che al

momento della morte, i topi trattati con LY341495 solo o combinato con temozolomide non mostrano anomalie gravi sia nella attività motoria spontanea che nella coordinazione motoria inoltre non mostrano alcuna riduzione di peso corporeo rispetto ai topi di controllo. Il fatto che il trattamento con temozolomide + LY341495 mantenga la sua efficacia anche quando iniziato 45 giorni dopo l'impianto è particolarmente promettente per la passaggio del trattamento alla pratica clinica dove si riscontra un lungo intervallo di tempo tra l'inizio della malattia e il trattamento.

Dato che in vitro il blocco del recettore mGlu3 potenzia l'azione tossica della temozolomide sulle GSCs, ci siamo chiesti se i livelli di espressione di mGluR3 nella massa tumorale possano influenzare la sopravvivenza dei pazienti trattati con temozolomide. Abbiamo misurato i livelli di trascrizione di mGluR3 nelle masse tumorali di pazienti trattati con temozolomide e radioterapia, la correlazione tra i relativi livelli di mRNA e la sopravvivenza(OS) dei pazienti è riportata in (fig.6.26). Sono stati considerati come normali i livelli di mRNA di mGluR3 misurati in campioni di tessuto cerebrale che non mostrano anomalie istologiche, in una corte di 67 campioni di GBM abbiamo osservato che: in 12 casi i livelli di mRNA rientravano nei valori di normalità, in 25 casi erano più alti mentre in 30 casi risultavano al di sotto del range(fig.6.27).

L'analisi delle curve di Kaplan-Meier che mettono in relazione la sopravvivenza del paziente con il livello di espressione del mRNA di mGlu3 nella massa tumorale indica un aumento della sopravvivenza ($p = 0,0047$) in pazienti con livelli di espressione inferiore al range di normalità (fig.6.28). È interessante notare che tutti e 5 i pazienti che hanno mostrato una sopravvivenza maggiore di 36 mesi presentano livelli di espressione di mGluR3 al di sotto del normale. Abbiamo anche messo in relazione l'espressione del recettore mGlu3 con lo stato di metilazione del promotore di MGMT ed è stato osservato che il gruppo con bassi livelli sia di espressione di mGluR3 che di metilazione del promotore ha mostrato una maggiore sopravvivenza. Mentre pazienti con alta / normale espressione di mGluR3 ha mostrato una ridotta sopravvivenza indipendentemente dallo grado di metilazione del promotore di MGMT (fig.6.29). Questo potrebbe indicare quindi che il grado di metilazione di MGMT non sia l'unico meccanismo a influenzare la

sopravvivenza dei pazienti con GBM trattati con temozolomide ma che anche i livelli di mGlu3 sono stati correlati.

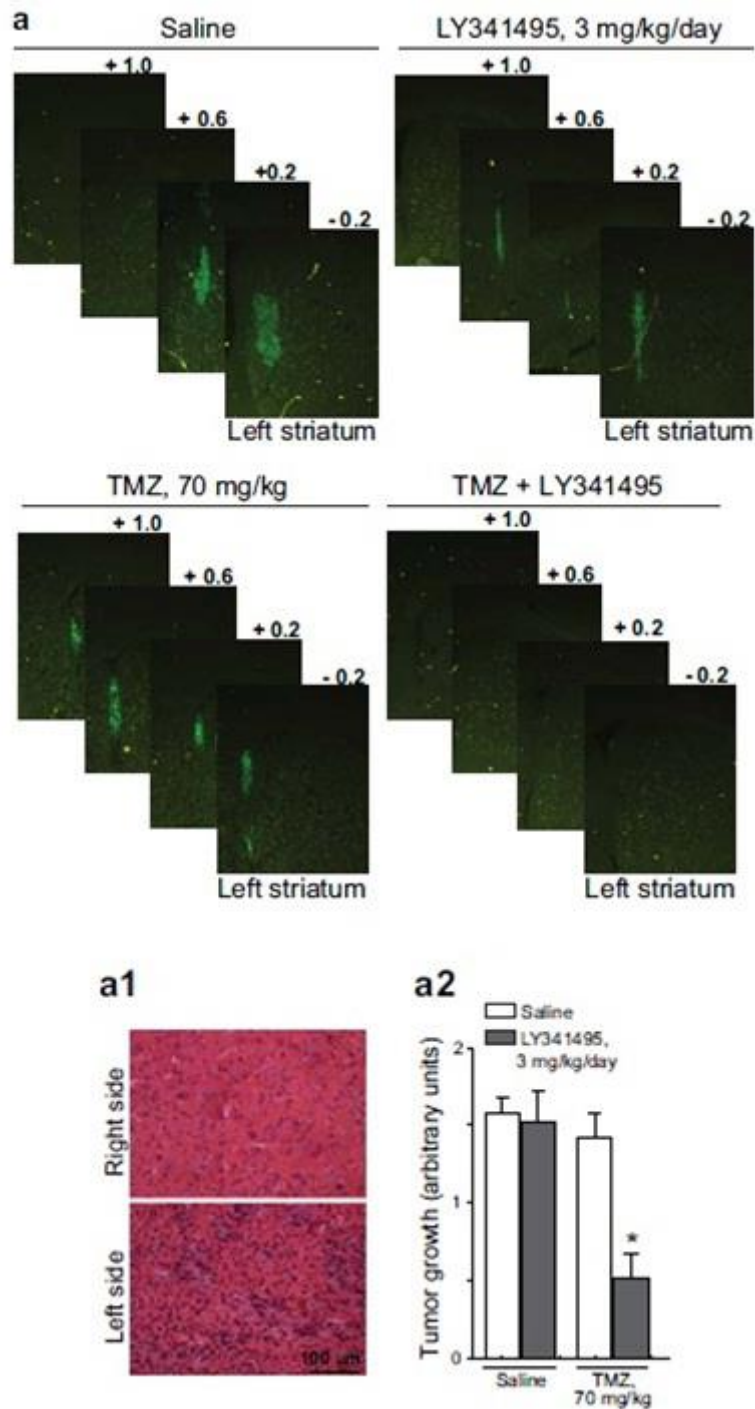


Figura 6.23: In (a), (a1) e (a2) topi sottoposti ad infusione stereotassica delle GSCs GFP+ a livello del nucleo caudato sinistro trattati con LY341495 (3 mg / kg / die per 28 giorni) o soluzione salina 15 giorni dopo la data dell'impianto. Contemporaneamente, hanno ricevuto, a giorni alterni, tre iniezioni o di Temozolomide (70mg/kg,i.p.) o di soluzione salina durante la prima settimana dall'impianto e sacrificati dopo 45 giorni dallo stesso. Le immagini in (a) mostrano la presenza di GSCs GFP+ nel sito di iniezione. I numeri da 1; 0 a □; 2 si riferiscono alla distanza (in mm) dal bregma. Le caratteristiche istologiche del tumore sono ottenute mediante colorazione con ematossilina/eosina (a1). La crescita del GSCs è stata valutata mediante microscopia a fluorescenza delle GSCs GFP+ in (a2) i valori sono indicati come la media + S.E.M. di 8 □ 10 topi per gruppo. $P < 0:05$ (One-way ANOVA + test Tukey st) vs tutti gli altri valori.

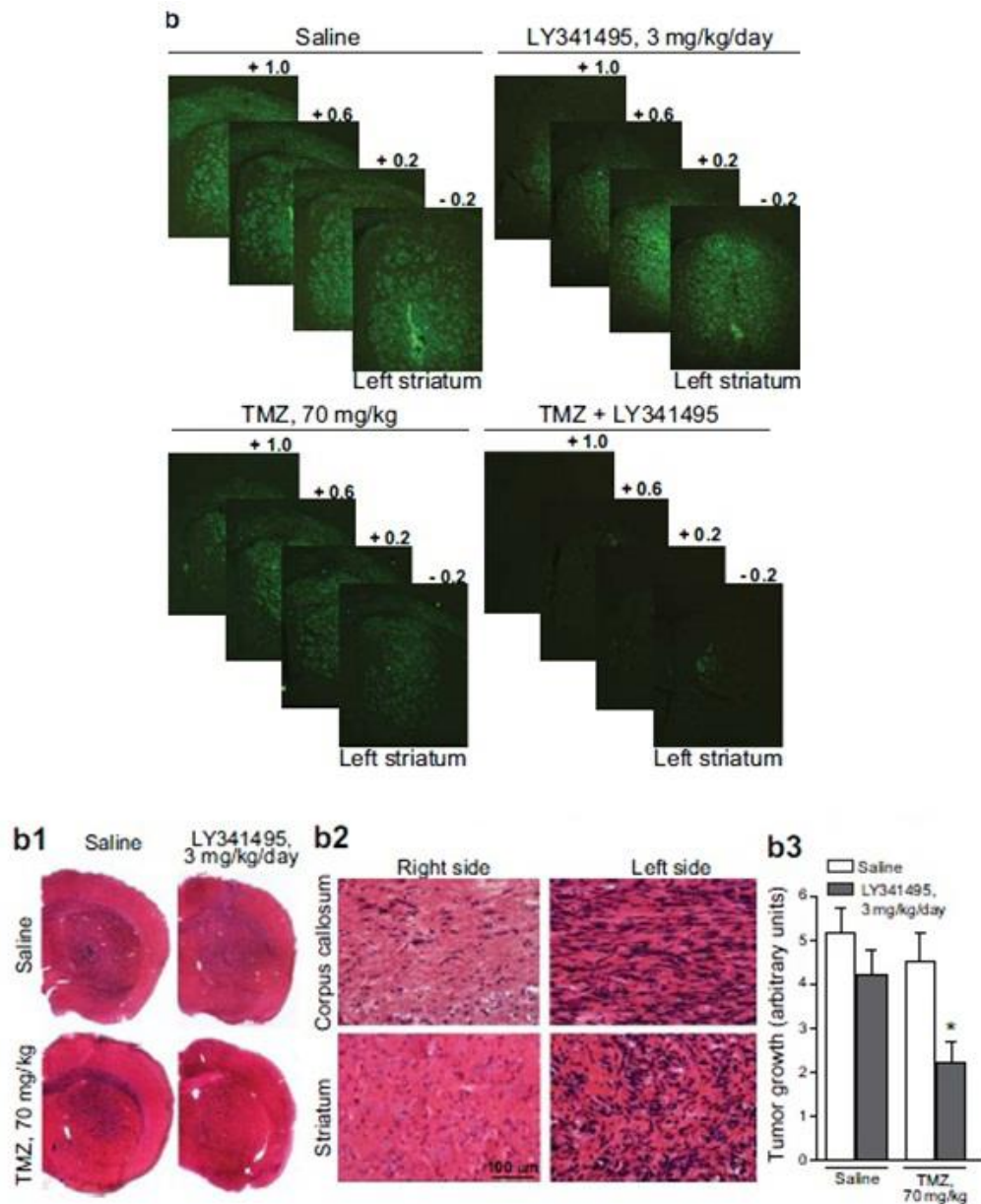


Figura 6.24: In (b), (b1) e (b2) topi sottoposti ad infusione stereotassica delle GSCs GFP+ a livello del nucleo caudato sinistro trattati con LY341495 (3 mg / kg / die per 28 giorni) o soluzione salina 45 giorni dopo la data dell'impianto. Contemporaneamente, hanno ricevuto, a giorni alterni, tre iniezioni o di Temozolomide (70mg/kg,i.p.) o di soluzione salina durante la prima settimana dall'impianto e sacrificati dopo 75 giorni dallo stesso. Le immagini in (b) mostrano la presenza di GSCs GFP + nel sito di iniezione. I numeri da 1; 0 a □0; 2 si riferiscono alla distanza (in mm) dal bregma. Le caratteristiche istologiche del tumore sono ottenute mediante colorazione con ematossilina/eosina (b1 e b2). La crescita del GSCs è stata valutata mediante microscopia a fluorescenza delle GSCs GFP+ in (b3) i valori sono indicati come la media + SEM di 6□8 topi per gruppo. $P < 0:05$ (One-way ANOVA + test Tukey st) vs tutti gli altri valori.

#	Age	Sex	KPS	Survival (mos)	Surgical resection	Ki-67 (%)	MGMT	mGlu3 value	mGlu3 expression
1	42	F	>70	78	total	15	M	0.069	Low
2	69	M	>70	25	total	40	M	0.420	High
3	47	M	>70	27	partial	35	M	0.143	Low
4	56	M	>70	16	total	20	UM	0.082	Low
5	66	M	>70	16	total	40	UM	0.023	Low
6	51	F	<70	11	total	50	UM	0.047	Low
7	75	F	<70	5	partial	20	UM	0.037	Low
8	61	M	<70	9	total	40	UM	0.110	Low
9	56	M	<70	23	total	25	M	0.171	Low
10	59	F	<70	13	total	50	UM	0.536	High
11	77	F	<70	6.5	total	20	UM	0.420	High
12	30	F	>70	55	total	50	UM	0.165	Low
13	77	M	>70	13	total	60	UM	1.414	High
14	69	M	>70	4	total	50	M	0.233	"Normal"
15	72	F	>70	11	total	5	UM	0.165	Low
16	76	M	>70	22	partial	8	UM	0.041	Low
17	62	F	>70	9	total	20	UM	0.105	Low
18	47	M	>70	19	total	30	M	0.033	Low
19	64	F	<70	6	partial	35	M	0.297	"Normal"
20	49	M	>70	38	partial	15	UM	0.105	Low
21	67	F	<70	8.5	total	20	UM	0.045	Low
22	68	M	>70	37	total	15	UM	0.500	High
23	64	F	<70	19	total	10	M	2.070	High
24	55	M	>70	9.5	partial	30	M	0.250	"Normal"
25	46	M	<70	9.5	partial	10	M	0.047	Low
26	72	M	<70	11	total	20	UM	0.870	High
27	54	F	<70	18	total	5	UM	0.060	Low
28	48	F	>70	6	total	15	M	0.287	"Normal"
29	58	M	<70	10.5	total	10	UM	0.319	"Normal"
30	51	M	>70	12.5	partial	25	UM	0.277	"Normal"
31	66	M	>70	11	partial	10	UM	0.241	"Normal"
32	59	M	>70	6	total	35	UM	0.483	High
33	64	M	>70	14	total	10	M	0.392	"Normal"
34	74	M	<70	5.5	total	15	M	1.569	High
35	50	M	>70	11	total	30	M	0.933	High
36	62	F	<70	19	total	35	M	0.091	Low
37	70	F	<70	8	total	15	UM	0.134	Low
38	70	M	<70	9	total	20	M	0.047	Low
39	66	M	<70	3.5	total	25	M	0.044	Low
40	52	F	<70	26	total	20	M	0.683	High
41	64	M	>70	15	total	15	M	1.035	High
42	53	M	>70	11	total	30	UM	0.732	High
43	58	M	>70	12.5	total	35	UM	0.085	Low
44	56	F	>70	12	total	25	UM	1.516	High
45	52	M	<70	10	total	50	UM	2.143	High
46	67	M	>70	7.5	total	30	M	1.741	High
47	48	M	>70	4	total	50	M	0.020	Low
48	67	M	<70	20	total	20	UM	0.217	"Normal"
49	71	F	<70	3	partial	20	M	1.800	High
50	76	F	<70	4	partial	25	M	0.088	Low
51	52	M	>70	20	total	30	UM	0.121	Low
52	69	F	<70	3	total	25	M	0.423	High
53	48	M	<70	2	total	25	UM	0.268	"Normal"
54	69	F	<70	11	total	25	UM	1.274	High
55	52	M	<70	19	partial	20	UM	0.203	Low
56	55	M	<70	2	total	50	UM	0.732	High
57	68	M	<70	8	total	25	UM	2.070	High
58	80	M	>70	4.5	total	25	M	0.250	"Normal"
59	33	M	<70	65	total	20	UM	0.109	Low
60	67	F	<70	10	total	10	UM	0.139	Low
61	40	M	<70	2	total	20	UM	0.528	High
62	55	F	>70	24	total	15	UM	0.595	High
63	50	F	>70	3.5	partial	40	M	0.500	High
64	71	M	>70	23.5	total	10	UM	2.297	High
65	42	M	>70	85.5	total	15	M	0.031	Low
66	57	M	>70	3	partial	30	M	0.225	"Normal"
67	67	M	>70	19	total	10	UM	0.072	Low

Figura 6.26: Caratteristiche chimiche e molecolari dei 67 pazienti con GBM.

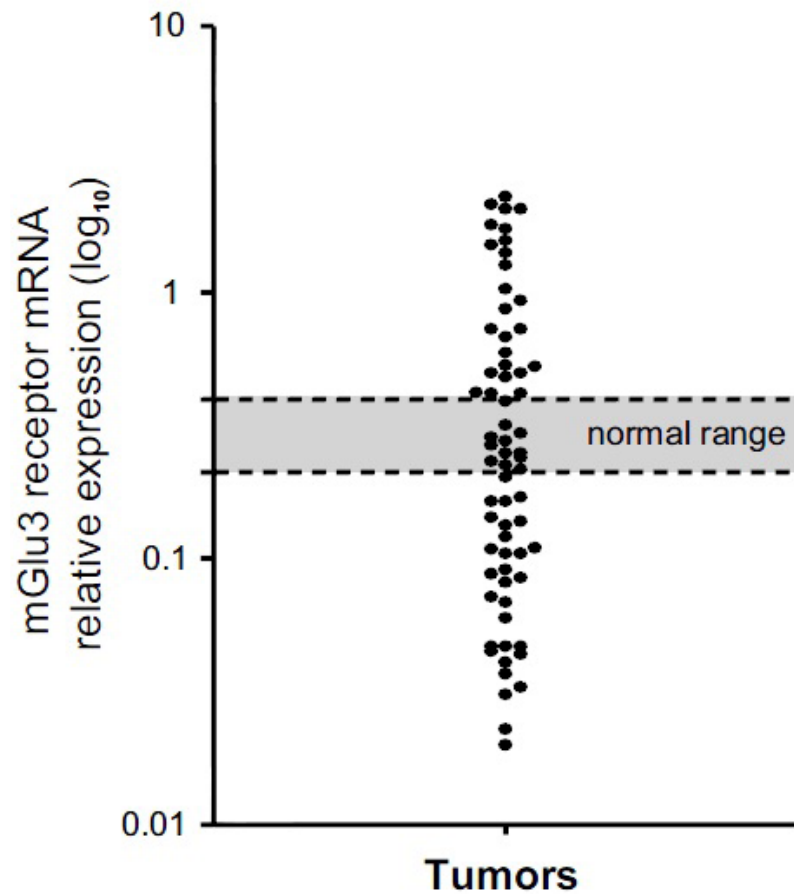


Figura 6.27: Correlazione tra relativi i livelli di mRNA e la sopravvivenza(OS) di pazienti con GBM trattati con Temozolomide. Sono stati considerati come Normali i livelli di mRNA di mGluR3 misurati in campioni di tessuto cerebrale che non mostrano anomalie istologiche. In una corte di 67 campioni di GBM abbiamo osservato che: in 12 casi i livelli di mRNA rientravano nei valori di normalità, in 25 casi erano più alti mentre in 30 casi risultavano al di sotto del range.

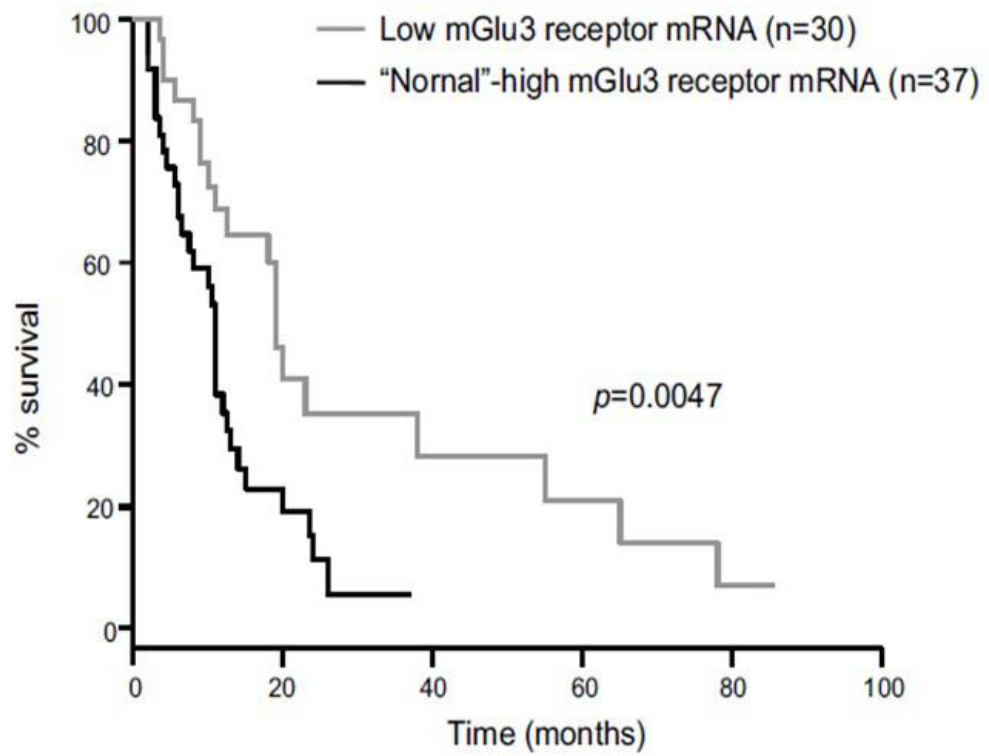


Figura 6.28: Analisi di Kaplan-Meier che mette in relazione la sopravvivenza del paziente con il livello di espressione del mRNA di mGlu3 nella massa tumorale

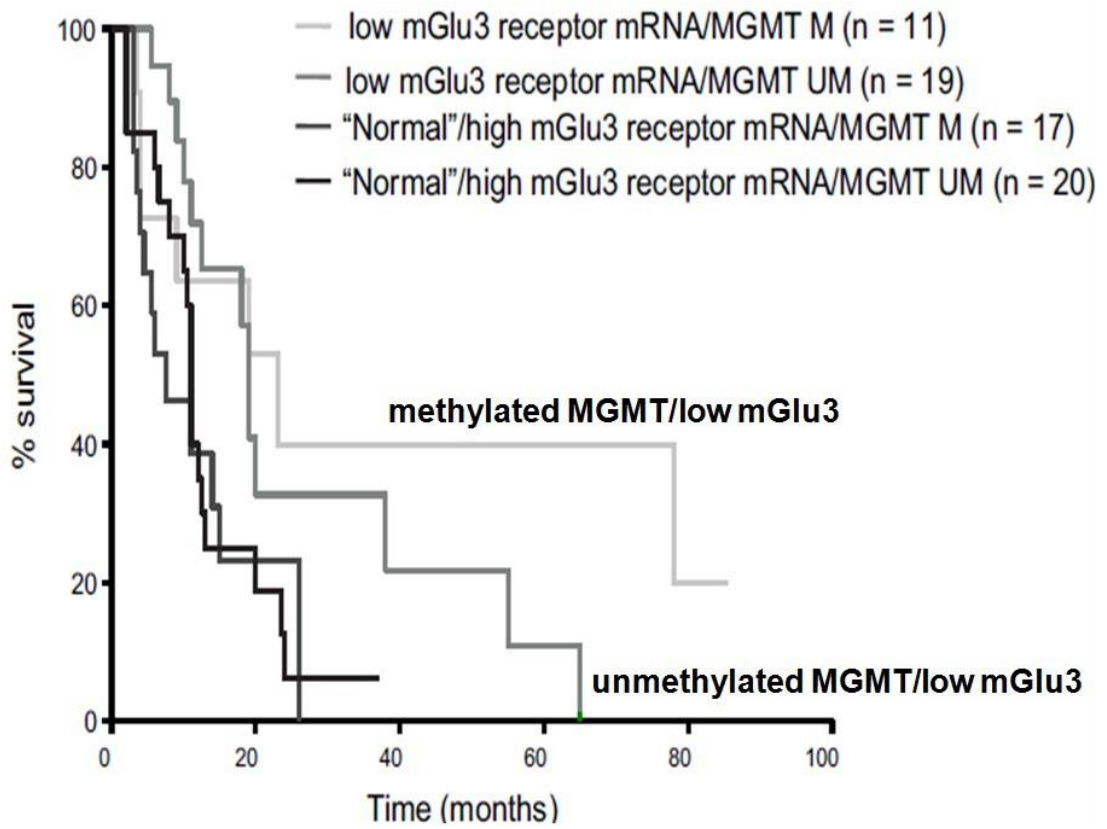


Figura 6.29: Relazione tra l'espressione del recettore mGlu3 e lo stato di metilazione del promotore di MGMT con la sopravvivenza dei pazienti.

Capitolo 7

Discussione

Il rilascio di glutammato da parte delle cellule di glioma sembra giocare un ruolo centrale nella malignità del tumore principalmente in tre modi:

- causando la neurodegenerazione per eccitotossicità delle cellule circostanti ;
- attivando i recettori neuronali del glutammato che causano le crisi epilettiche, (Sontheimer, 2003, 2008; Lyons et al., 2007; Noch and Khalili, 2009; Buckingham et al., 2011) ;
- regolando sia la proliferazione che l'invasione perivascolare delle cellule cancerose, attraverso l'attivazione autocrina e paracrina dei recettori AMPA (Yoshida et al., 2006; Ishiuchi et al., 2007; de Groot et al., 2008; Piao and de Groot, 2009; Savaskam et al., 2011; de Groot and Sontheimer, 2011).

I nostri dati dimostrano un nuovo ruolo del glutammato nel regolare la biologia delle cellule staminali tumorali.

La concentrazione di glutammato rilasciato dalle cellule staminali di glioblastoma in coltura (concentrazione extracellulare = 4-10 μ M) è sufficiente ad attivare i recettori mGlu3, che sono risultati essere espressi e funzionali in tutti i nostri cloni di Glioma Stem Cells (per i valori di EC_{50} per i recettori mGlu3 ci riferiamo a Schoepp et al., 1999). Tutti i nostri cloni di GSC in coltura si sono dimostrati altamente resistenti all'attività citotossica della temozolomide a meno che i recettori mGlu3 non fossero bloccati farmacologicamente o silenziati. E' noto infatti che l'inibizione della PtdIns-3-K e dei suoi pathways effettori possa facilitare la chemiotossicità della temozolomide (Prasad et al., 2011).

I dati ottenuti risultano comunque innovativi perché dimostrano come la PtdIns-3-K sia strettamente regolata dai recettori mGlu3, e che il blocco farmacologico dei recettori sia sufficiente per

reprimere l'espressione dell'enzima MGMT permettendo alla temozolomide di svolgere la sua attività citotossica. Questi dati suggeriscono inoltre, come, almeno nelle nostre condizioni sperimentali, altri recettori endogeni accoppiati alla PtdIns-3-K possano ripristinare l'espressione di MGMT quando i recettori mGlu3 sono bloccati farmacologicamente. NF κ B, che è attivato dal pathway della PtdIns-3-K/Akt (Vivanco and Sawyers, 2002), è uno dei più forti induttori dell'espressione di MGMT. In cellule ricombinanti gli omodimeri di NF κ B/p65 aumentano l'espressione di MGMT 7 volte più che AP1/c-jun e, fatto degno di nota, l'induzione mediata da NF κ B non risulta influenzata dallo stato di metilazione del promotore di MGMT (Lavon et al., 2007). Il lavoro dimostra come il blocco farmacologico del recettore mGlu3 sostanzialmente riduca il legame di NF κ B sul promotore di MGMT in GCSs trattate con temozolomide, ponendo l'attenzione sul fatto che l'attivazione del recettore mGlu3 potrebbe supportare l'espressione di MGMT anche quando il promotore di quest'ultimo si trova in uno stato di ipermetilazione. In accordo con questa teoria, la sopravvivenza dei pazienti trattati con temozolomide, nel cui tumore si riscontrava un'alto livello di mRNA del recettore mGlu3, è risultata completamente non influenzata dallo stato di metilazione del promotore di MGMT. I nostri dati suggeriscono inoltre come l'ipermetilazione del promotore del gene di MGMT possa ritenersi un indicatore positivo di sopravvivenza solo in quei pazienti che esprimono livelli bassi di recettori mGlu3 nel tumore. Proprio questa dipendenza tra espressione del recettore mGlu3 e espressione di MGMT potrebbe spiegare i dati fino a qui controversi sulla correlazione tra stato di metilazione del promotore di MGMT e sopravvivenza dei pazienti. (Anda et al., 2003; Hegi et al., 2005, 2008; Donson et al., 2007; Eoli et al., 2007; Krex et al., 2007; Martinez et al., 2007; Dunn et al., 2009; Park et al., 2009; Sadones et al., 2009; Sonoda et al., 2010; Spiegl-Kreinecker et al., 2010; Karayan-Tapon et al., 2010; Combs et al., 2011; Kreth et al., 2011; Minniti et al., 2011; Ohka et al., 2011; Shah et al., 2011; Thon et al., 2011).

Tutti questi dati potrebbero aprire la strada a una nuova strategia nel trattamento farmacologico dei gliomi maligni, dal momento che antagonisti dei recettori mGlu3 potrebbero essere affiancati alla

temozolomide o agli altri agenti alchilanti per ottimizzare la terapia adiuvante. L'evidenza sperimentale per cui il trattamento combinato di temozolomide e LY341495 si è dimostrato efficace nel contenere la crescita del tumore, anche quando iniziato 45 giorni dopo l'impianto delle cellule nei topi, è particolarmente promettente nell'ottica di una trasposizione nella pratica medica, proprio per il lungo periodo intercorso tra l'insorgenza del tumore e l'inizio del trattamento.

A differenza degli inibitori di enzimi intracellulari o fattori di trascrizione che regolano la chemioresistenza, come PtdIns-3-K o NF κ B, gli inibitori del recettore mGlu3 sono, almeno nelle previsioni, sicuri e ben tollerati, come dimostrato da tutti i trials clinici con ligandi del recettore mGlu3, in terapie neurologiche e psichiatriche (Vinson et al., 2011; Nicoletti et al., 2011). In accordo con questa previsione non si sono palesati segni di tossicità sistemica o disturbi motori in topi trattati con 3 mg/kg/day di LY341495, e, negli esperimenti in acuto, i topi sono sopravvissuti a dosi di LY341495 fino a 300 mg/kg, i.p.

In conclusione questi dati dimostrano come uno specifico sottotipo di recettore accoppiato a proteine G, attivato dal glutammato, possa regolare l'azione citotossica della temozolomide, influenzando l'espressione di MGMT in cellule staminali isolate da glioblastoma multiforme. Per questo, il glutammato, il più importante neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale, non è solo coinvolto nella regolazione della proliferazione e nell'invasione delle cellule tumorali, ma agisce anche come regolatore dei pathways di signaling intracellulare che mediano la chemioresistenza, addirittura limitando l'efficacia della terapia standard con agenti alchilanti.

Bibliografia

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, & Clarke MF. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 3983-3988.

Al Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, and Clarke MF (2004). Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 14: 43-47.

Alonso, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM. 2006. Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 26,10508-10513.

Anda T, Shabani HK, Tsunoda K, Tokunaga Y, Kaminogo M, Shibata S, Hayashi T, and Iseki M (2003). Relationship between expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, glutathione-S-transferase pi in glioblastoma and the survival of the patients treated with nimustine hydrochloride: an immunohistochemical analysis. *Neurol Res* 25: 241-248.

Androutsellis-Theotokis A., R. R. Leker et al. 2006. Notch signaling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature*, 442(7104), 823-6.

Angers S and Moon RT (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 468-477.

Anton ES, Ghashghaei HT, Weber JL, McCann C, Fischer TM, Cheung ID, Gassmann M, Messing A, Klein R, Schwab MH, Lloyd KC, Lai C. 2004. Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblasts migration and placement in the adult forebrain. *Nat Neurosci*, 7,1319-1328.

Arcella A., Carpinelli G., Battaglia G, D'Onofrio M, Santoro F, Ngomba R.T, Bruno V, Casolini P, Giangaspero F, Nicoletti F. 2005. Pharmacological blockade of group II metabotropic glutamate receptors reduces the growth of glioma cells in vivo. *Neuro Oncol.*, 7,236-245.

Argyriou AA and Kalofonos HP (2009). Molecularly targeted therapies for malignant gliomas. *Mol Med* 15: 115-122.

Bao S, Wu Q, McLendon RE et al. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444, 756-60.

Baron. 2003. An overview of the Notch signaling pathway. *Semin Cell Dev Biol*, 14(2), 113-9.

Bear M.F., Huber K.M., Warren S.T. 2004. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Drug Discov.Dev.*, 27, 370-377.

Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. 2007. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.*, 67(9), 4010-5.

Benedetti S, Pirola B, Pollo B, Magrassi L, Bruzzone MG, Rigamonti D, Galli R, Selleri S, Di Meco F, De Fraja C, Vescovi A, Cattaneo E, Finocchiaro G. 2000. Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med*, 6, 447-450.

Bidlingmaier S, Zhu X and Liu B (2008) The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med* 86: 1025-1032.

Blowers L., S. Preston-Martin et al. 1997. Dietary and other lifestyle factors of women with brain gliomas in Los Angeles County (California, USA). *Cancer Causes Control*, 8(1), 5-12.

Boiani MH, Scholer HR. 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11),872-84.

Brennan C., H. Momota et al. 2009. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One*, 4(11), e7752.

Brenner A. V., M. S. Linet et al. 2002. History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults. *Int J Cancer*, 99(2), 252-9.

Broxmeyer, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, Liles WC, Li X, Graham-Evans B, Campbell TB. 2005. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*, 201, 1307-1318.

Buckingham SC, Campbell SL, Haas BR, Montana V, Robel S, Ogunrinu T and Sontheimer H (2011). Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. *Nat Med* 17:1269-74.

Cao B, Huard J. 2004. Muscle-derived stem cells. *Cell Cycle*, 3(2), 104-107.

Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ. 2004. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet*, 36, 1827-835.

Cao VT, Jung TY, Jung S, Jin SG, Moon KS, Kim IY, Kang SS, Park CS, Lee KH and Chae HJ (2009) The correlation and prognostic significance of MGMT promoter methylation and MGMT protein in glioblastomas. *Neurosurgery* 65: 866-875.

Caraci F, Molinaro G, Battaglia G, Giuffrida ML, Rizzo B, Traficante A, Bruno V, Cannella M, Merlo S, Drago F, Sortino MA, Copani A and Nicoletti F (2011). Targeting group-II metabotropic glutamate receptors for the treatment of psychosis associated with Alzheimer's disease: dual activation of mGlu2 and mGlu3 receptors is neuroprotective, whereas selective activation of mGlu2 receptors amplifies β -amyloid toxicity. *Mol Pharm* 79: 618-626.

Chamberlain. 2006. Treatment options for glioblastoma. *Neurosurg Focus*, 20(4), E19.

Chang F., L. S. Steelman et al. 2003. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol*, 22(3), 469-80.

Cheng CK, Fan QW, Weiss WA (2009). PI3K signaling in glioma-animal models and therapeutic challenges. *Brain Pathol* 19: 112-120.

Ciceroni C, Arcella A, Mosillo P, Battaglia G, Mastrantoni E, Oliva MA, Carpinelli G, Santoro F, Sale P, Ricci-Vitiani L, De Maria R, Pallini R, Giangaspero F, Nicoletti F, Melchiorri D. 2008. Type-3 metabotropic glutamate receptors negatively modulate bone morphogenetic protein receptor signaling and support the tumorigenic potential of glioma-initiating cells. *Neuropharmacology*. 55: 568-576.

Cichowski, Jacks. 2001. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell*, 104(4), 593-604.

Cohen M. H., Y. L. Shen et al. 2009. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Oncologist*, 14(11), 1131-8.

Combs SE, Rieken S, Wick W, Abdollahi A, von Deimling A, Debus J and Hartmann C (2011). Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma: One step forward, and one step back? *Radiat Oncol* 6: 115.

Cordier S, B. Lefevre et al. 1997. Arental occupation, occupational exposure to solvents and polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of childhood brain tumors (Italy, France, Spain). *Cancer Causes Control*, 8(5), 688-97.

De Groot J.F, Piao Y, Lu L, Fuller GN and Yung, WK (2008). Knockdown of GluR1 expression by RNA interference inhibits glioma proliferation. *J Neurooncol* 88: 121-133.

De Groot J and Sontheimer H (2011). Glutamate and the biology of gliomas. *Glia* 59: 1181-1189.

De Paepe B, Schroder JM, Martin JJ, Racz GZ, De Bleecker JL 2004. Localization of the alpha-chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuromuscul Dis*, 14,265-273.

De Roos A. J., P. A. Stewart et al. 2003. Occupation and the risk of adult glioma in the United States. *Cancer Causes Control*, 14(2), 139-50.

De Witt Hamer PC (2010). Small molecule kinase inhibitors in glioblastoma: a systematic review of clinical studies. *Neuro Oncol* 12: 304-316.

Di Giorgi Gerevini V, Melchiorri D, Battaglia G, Ricci-Vitiani L, Ciceroni C, Busceti CL, Biagioni F, Iacovelli L, Canudas AM, Parati E, De Maria R, Nicoletti F 2005. Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells. *Cell Death Differ*.

Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36,1021-1034.

D'Onofrio M, Arcella A, Bruno V, Ngomba RT, Battaglia-Lombari V, Ragona G, Calogero A, Nicoletti F 2003. Pharmacological blockade of mGlu2/3 metabotropic glutamate receptors reduces cell proliferation in cultured human glioma cell. *J Neurochem*.

Donson AM, Addo-Yobo SO, Handler MH, Gore L and Foreman NK (2007). MGMT promoter methylation correlates with survival benefit and sensitivity to temozolomide in pediatric glioblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 48: 403-407.

Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, Wong H, Liloglou T, Haylock B and Walker C (2009). Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer* 101: 124-131.

Ehebauer P, Hayward et al. 2006. Notch signaling pathway. *Sci STKE*.

Elexpuru-Camiruaga J, N. Buxton et al. 1995. Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci. *Cancer Res*, 55:19, 4237-9.

Elmore 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516.

Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Larocca LM, Peschle C and De Maria R (2006). Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ* 13: 1238-1241.

Eoli M, Menghi F, Bruzzone MG, De Simone T, Valletta L, Pollo B, Bissola L, Silvani A, Bianchessi D, D'Incerti L, Filippini G, Broggi G, Boiardi A and Finocchiaro G (2007). Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. *Clin Cancer Res* 13: 2606-2613.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG 1999. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*, 59, 793-7.

Ferraguti F, Baldani-Guerra B, Corsi M, Nakanishi S, Corti C. 1999. Activation of the extracellular signal-regulated kinase 2 by metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci*.

Franklin KBJ, Paxinos G (1997). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. London: Academic.

Friedman H. S., R. E. McLendon et al. 1998. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol*, 16(12), 3851-7.

Friedman HS, Kerby T, Calvert H. 2000. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res*.

Fronza G., Gold B. 2004. The biological effects of N3-methyladenine. *J. Cell. Biochem.*, 91, 250-257.

Gage 2000. Mammalian neural stem cells. *Genes Dev*, 287,1433-1438.

Gaiano N., J. S. Nye et al. 2000. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*, 26(2),395-404.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A 2004. Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Res*, 64, 7011-7021.

Gerson 2004. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer.*, 4, 296-307.

Grimes CA and Jope RS (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65: 391-426.

Gomez-Manzano C., P. Mitlianga et al. 2001. Transfer of E2F-1 to human glioma cells results in transcriptional upregulation of Bcl-2. *Cancer Res*, 61(18), 6693-7.

Guha A., M. M. Feldkamp et al. 1997. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *POncogene*,15(23), 2755-65.

Guzman R, Uchida N, Bliss T, He D, Christopherson KK, Stellwagen D, Capela A, Greve J, Malenka RC, Moseley ME, Palmer TD, Steinberg GK 2007. Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(24), 10211-10216.

Hadjipanayis CG and Van Meir EG (2009). Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med* 15: 519-530.

Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D 2006. Sp analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res*, 312, 3701-3710.

Han L, Yang Y, Yue X, Huang K, Liu X, Pu P, Jiang H, Yan W, Jiang T and Kang, C (2010). Inactivation of PI3K/AKT signaling inhibits glioma cell growth through modulation of β -catenin-mediated transcription. *Brain Res* 1366: 9-17.

Harrisingh, & Lloyd. 2004. Ras/Raf/ERK signaling and NF1. *Cell Cycle*, 3(10), 1255-8.

Hau P, Stupp R, Hegi ME 2007. MGMT methylation status: the advent of stratified therapy in glioblastoma? *Dis Markers*.

Hawke, Garry 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 91, 534-551.

He J., G. Reifenberger et al. 1994. Analysis of glioma cell lines for amplification and overexpression of MDM2. *Genes Chromosomes Cancer*, 11(2), 91-6.

Hegi M. E., A. C. Diserens et al. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10), 997-1003.

Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP and Gilbert MR (2008). Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 26: 4189-4199.

Hermanson M., K. Funa et al. 1992. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res*, 52(11), 3213-9.

Hochberg F., P. Toniolo et al. 1984. Head trauma and seizures as risk factors of glioblastoma. *Neurology*, 34(11), 1511-4.

Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, Orkin SH 2004. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature*, 431, 1002-1007.

Hu X, Pandolfi PP, Li Y, Koutcher JA, Rosenblum M and Holland EC (2005). mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by Pten/AKT signaling in glioblastoma. *Neoplasia* 7: 356-568.

Huang H., R. Reis et al. 1999. Identification in human brain tumors of DNA sequences specific for SV40 large T antigen. *Brain Pathol*, 9(1), 33-42.

Huang TT, Sarkaria SM, Cloughesy TF and Mischel PS (2009). Targeted therapy for malignant glioma patients: lessons learned and the road ahead. *Neurotherapeutics* 6: 500-512.

Huncharek M., B. Kupelnick et al. 2003. Dietary cured meat and the risk of adult glioma: a meta-analysis of nine observational studies. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 22(2), 129-37.

Iacovelli L, Arcella A, Battaglia G, Pazzaglia S, Aronica E, Spinsanti P, Caruso A, De Smaele E, Saran A, Gulino A, D'Onofrio M, Giangaspero F, Nicoletti F 2006. Pharmacological activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors inhibits the growth of medulloblastomas. *J Neurosci*, 26, 8388-8397.

Ikonomov OC and Manji HK (1999). Molecular mechanisms underlying mood stabilization in manic-depressive illness: the phenotype challenge. *Am J Psychiatry* 156: 1506-1514.

Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, Frenkel D, Li J, Sidman RL, Walsh CA, Snyder EY, Khoury SJ 2004. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 α /CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(52), 18117-22.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J and Guan KL (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. *Nat Cell Biol* 4: 648-657.

Inskip P. D., R. E. Tarone et al. 2001. Cellular-telephone use and brain tumors. *N Engl J Med*, 344(2), 79-86.

Ishiuchi S, Yoshida Y, Sugawara K, Aihara M, Ohtani T, Watanabe T, Saito N, Tsuzuki K, Okado H, Miwa A, Nakazato Y and Ozawa S (2007). Ca²⁺-permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation. *J Neurosci* 27: 7987-8001

Jennings M. T., C. E. Hart et al. 1997. Transforming growth factor beta as a potential tumor progression factor among hyperdiploid glioblastoma cultures: evidence for the role of platelet-derived growth factor. *J Neurooncol*, 31(3), 233-54.

Jiang X, Yu Y, Yang HW, Agar NY, Frado L and Johnson MD (2010). The imprinted gene PEG3 inhibits Wnt signaling and regulates glioma growth. *J Biol Chem* 285: 8472-8480.

Johnson M. D., M. T. Jennings et al. 1993. Transforming growth factor-beta in neural embryogenesis and neoplasia. *Hum Pathol*, 24(5), 457-62.

Jordan CT, Guzman ML, Noble M. 2006. Cancer stem cells. *N Engl J*, 21,1253-61.

Kang MK and Kang SK (2007). Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. *Stem Cells Dev* 16: 837-847.

Kanu O. O., B. Hughes et al. 2009. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol*, 3,39-52.

Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, Wager M, Fromont G, Saikali S, Etcheverry A, Hamlat A, Loussouarn D, Campion L, Campone M, Vallette F.M and Gratas-Rabbia-Ré C (2010). Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol* 97: 311-322.

Kempermann G, Gage FH. 2002. Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur J Neurosci*, 16,129-136.

Kenny P.J., Markou, A 2004. The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. *Trends Pharmacol.Sci*,1, 265-272.

Kim I, Saunders TL, Morrison SJ 2007. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell*, 130, 470-48.

Kopp E and Ghosh S (1994). Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265: 956-959.

Kreth S, Thon N, Eigenbrod S, Lutz J, Ledderose C, Egensperger R, Tonn JC, Kretschmar HA, Hinske LC and Kreth FW (2011). O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation. *PLoS One* 6: e17156.

Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G and German Glioma Network (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 130: 2596-2606.

Kunishima M, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K 2000. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor . *Nature*, 407, 971-977.

Labuhn M, G. Jones et al. 2001. Quantitative realtime PCR does not show selective targeting of p14(ARF) but concomitant inactivation of both p16(INK4A) and p14(ARF) in 105 human primary gliomas. *Oncogene*, 20(9), 1103-9.

Laird DJ, von Handrian UH, Wagers AJ 2008. Stem Cell Trafficking in Tissue Development, Growth, and Disease. *Cell*, 132, 612-630.

Lavon I, Dana Fuchs, Daniel Zrihan, Gilat, Efroni, Bracha, Zelikovitch, Yakov, Fellig, & Siegal, Tali 2007. Novel Mechanism whereby Nuclear Factor KB Mediates DNA Damage Repair through Regulation of O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase. *Cancer Res*, 67,8952-8959.

Lee M., M. Wrensch et al. 1997. Dietary and tobacco risk factors for adult onset glioma in the San Francisco Bay Area (California,USA). *Cancer Causes Control*, 8(1), 13-24.

Legler J. M., L. A. Rieset al. 1999. Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst*, 91(16), 1382-90.

Li C. C., Tzeng et al. 2006. Genomic alterations in human malignant glioma cells associate with the cell resistance to the combination treatment with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 12(9), 2716-29.

Libermann T. A., H. R. Nusbaum et al. 1985. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*,313(5998), 144-7.

Liu G, Yuan X, Zeng Z et al. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5, 67.

Loeb. 1991. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res*, 51(12), 3075-9.

Lopes. 2003. Angiogenesis in brain tumors. *Microsc Res Tech*,60(2), 225-30.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.*, 2,97-109.

Lu C and Shervington A (2008). Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem* 312: 71-80.

Lyons SA, Chung WJ, Weaver AK, Ogunrinu T and Sontheimer H (2007). Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer Res* 67: 9463-9471.

Major MB, Camp ND, Berndt JD, Yi X, Goldenberg SJ, Hubbert C, Biechele TL, Gingras AC, Zheng N, Maccoss MJ, Angers S and Moon RT (2007). Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* 316: 1043-1046.

Malmer B, H. Gronberg et al. 1999. Familial aggregation of astrocytoma in northern Sweden: an epidemiological cohort study. *Int J Cancer*, 81(3), 366-70.

Martinez R, Schackert G, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Herman JG and Esteller M (2007). Frequent hypermethylation of the DNA repair gene MGMT in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 83: 91-93.

Martini M, Pallini R, Luongo G, Cenci T, Lucantoni C, Larocca LM (2008). Prognostic relevance of SOCS3 hypermethylation in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Cancer* 123:2955-2960.

Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, Kollnberger M, Tubo N, Moseman A, Huff IV, Junt T, Wagers AJ, Mazo IB, von Andrian UH 2007. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell*, 131,994-1008.

Matheu A, A. Maraver et al. 2008. The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer Res*, 68(15), 6031-4.

Matsuura I., N. G. Denissova et al. 2004. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature*,430(6996), 226-31.

Merzak A., S. McCrea et al. 1994. Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1. *Br J Cancer*, 70(2), 199-203.

Minniti G, Salvati M, Arcella A, Buttarelli F, D'Elia A, Lanzetta G, Esposito V, Scarpino S, Maurizi Enrici R and Giangaspero F (2010). Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in elderly patients with glioblastoma treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide. *J Neurooncol* 102: 311-316.

Miller. 1971. Deaths from childhood leukemia and solid tumors among twin and other sibs in the United States, 1960-67. *J Natl Cancer Inst*, 46(1), 203-9.

Mischel PS, Shai R, Shi T, Horvath S, Lu KV, Choe G, Seligson D, Kremen TJ, Palotie A, Liao LM, Cloughesy TF, Nelson SF 2003. Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogene*.

Moss. 1985. Occupational exposure and brain tumors. *J Toxicol Environ Health*, 16(5),703-11.

Myers M. P., I. Pass et al. 1998. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23), 13513-8.

Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG 2003. Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb Cortex*, 13(6), 1607-611.

Nakamura M., T.Watanabe et al. 2001. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol*,11(2), 159-68.

Neglia J. P., A. T. Meadows et al. 1991. Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med*,325(19), 1330-6.

Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knöpfel T 1996. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci*.

Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, Wroblewski JT and Pin JP (2011). Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 60: 1017-1041.

Noch E and Khalili K (2009). Molecular mechanisms of necrosis in glioblastoma: the role of glutamate excitotoxicity. *Cancer Biol Ther* 8: 1791-1797.

Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA et al. 2008. Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery*, 62, 505-14.

Ohgaki H., H. Huang et al. 2000. More about: cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst*, 92(6), 495-7.

Ohka F, Natsume A, Motomura K, Kishida Y, Kondo Y, Abe T, Nakasu Y, Namba H, Wakai K, Fukui T, Momota H, Iwami K, Kinjo S, Ito M, Fujii M and Wakabayashi T (2011). The global DNA methylation surrogate LINE-1 methylation is correlated with MGMT promoter methylation and is a better prognostic factor for glioma. *PLoS One* 6: e23332.

Olivier M, D. E. Goldgar et al. 2003. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res*, 63(20), 6643-50.

Olson, Ryken. 2008. Guidelines for the treatment of newly diagnosed glioblastoma: introduction. *J Neurooncol*, 89(3), 255-8.

Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna GL, Signore M, Lombardi D, Todaro M, Stassi G, Martini M, Maira G, Larocca LM and De Maria R (2008). Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 14: 8205-8212.

Pallini R, Ricci-Vitiani L, Montano N, Mollinari C, Biffoni M, Cenci T, Pierconti F, Martini M, De Maria R, Larocca LM 2011. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis. *Cancer.*, 117(1), 162-74.

Pan S. Y., A. M. Ugnat et al. 2005. Occupational risk factors for brain cancer in Canada. *J Occup Environ Med*, 47(7), 704-17.

Park CK, Park SH, Lee SH, Kim CY, Kim DW, Paek SH, Kim DG, Heo DS, Kim IH and Jung HW (2009). Methylation status of the MGMT gene promoter fails to predict the clinical outcome of glioblastoma patients treated with ACNU plus cisplatin. *Neuropathology* 29: 443-449.

Parsons D. W., S. Jones et al. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321(5897),1807-12.

Paternot S., L. Bockstaele et al. 2010. Rb inactivation in cell cycle and cancer: the puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK4 versus constitutively active CDK-activating kinase. *Cell Cycle*, 9(4), 689-99.

Paulus W., I. Baur, et al. 1995. Effects of transforming growth factor-beta 1 on collagen synthesis, integrin expression, adhesion and invasion of glioma cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 54(2), 236-44.

Pegg. 2000. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res.*, 462, 83-100.

Peiffer, Kleihues. 1999. Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research. *Brain Pathol*, 9(2), 241-5.

Peters F. M., S. Preston-Martin et al. 1981. Brain tumors in children and occupational exposure of parents. *Science*,213(4504), 235-7.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R et al. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9,157-73.

Piao Y, Lu L and de Groot J (2009). AMPA receptors promote perivascular glioma invasion via beta1 integrin-dependent adhesion to the extracellular matrix. *Neuro Oncol* 11: 260-273.

Prasad G, Sottero T, Yang X, Mueller S, James CD, Weiss WA, Polley MY, Ozawa T, Berger MS, Aftab DT, Prados MD, Haas-Kogan DA (2011). Inhibition of PI3K/mTOR pathways in glioblastoma and implications for combination therapy with temozolomide. *Neuro Oncol* 13: 384-392.

Preston D. L., E. Ron et al. 2002. Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure. *J Natl Cancer Inst*, 94(20), 1555-63.

Preston-Martin, W. Mockett et al. 1989. Risk factors for gliomas and meningiomas in males in Los Angeles County.. *Cancer Res*, 49(21), 6137-43.

Purow B. W., R. M. Haque et al. 2005. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res*, 65(6), 2353-63.

Quiros Steve, Roos Wynand P, Kaina Bernd. 2010. Processing of O(6)-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle*, 63, 1099-111.

Reynolds BA and Vescovi AL (2009). Brain cancer stem cells: Think twice before going flat. *Cell Stem Cell* 5: 466-467.

Ricci-Vitiani L, Pedini F, Mollinari C, Condorelli G, Bonci D, Bez A, Colombo A, Parati E, Peschle C, De Maria R (2004). Absence of caspase 8 and high expression of PED protect primitive neural cells from cell death. *J Exp Med* 200: 1257-1266.

Ron E., B. Modan et al. 1988. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N Engl J Med*, 319(16),1033-9.

Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A. 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*.

Sadones J, Michotte A, Veld P, Chaskis C, Sciote R, Menten J, Joossens EJ, Strauven T, D'Hondt LA, Sartenaer D, Califice SF, Bierau K, Svensson C, De Grève J and Neyns B (2009). MGMT promoter hypermethylation correlates with a survival benefit from temozolomide in patients with recurrent anaplastic astrocytoma but not glioblastoma. *Eur J Cancer* 45: 146-153.

Sarkaria JN, Kitange GJ, James CD, Plummer R, Calvert H, Weller M and Wick W (2008). Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clin Cancer Res* 14: 2900-2908.

Savaskan NE, Seufert S, Hauke J, Tränkle C, Eyüpoglu IY and Hahnen E (2011). Dissection of mitogenic and neurodegenerative actions of cystine and glutamate in malignant gliomas. *Oncogene* 30: 43-53.

Schneider, Victor 1993. The Turcot syndrome (glioma polyposis) and its neurosurgical significance. Case report. *Neurosurg Rev*, 16(4), 327-30.

Schoepp DD, Jane DE, Monn JA 1999. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*.

Shah N, Lin B, Sibenaller Z, Ryken T, Lee H, Yoon JG, Rostad S and Foltz G (2011). Comprehensive analysis of MGMT promoter methylation: correlation with MGMT expression and clinical response in GBM. *PLoS One* 6: e16146.

Shaw R. J., J. G. Paez et al. 2001. The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling. *Dev Cell*, 1(1), 63-72.

Sherr C. J., J. D. Weber. 2000. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev*, 10(1), 94-9.

Shin HM, Kim MH, Kim BH, Jung SH, Kim YS, Park HJ, Hong JT, Min KR and Kim Y (2004). Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF-kappaB without affecting IkappaB degradation. *FEBS Lett* 571: 50-54.

Shipe W.D, Wolkenberg S.E, Williams Jr. D.L, Lindsley C.W 2005. Recent advances in positive allosteric modulators of glutamate receptors. *Drug Discov.Dev.*, 8, 449-457.

Silber J. R., M. S. Bobola et al. 1998. O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics. *Cancer Res*, 58(5), 1068-73.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63, 5821-8.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD and Dirks PB (2004). Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature* 430: 396-401.

Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, Gaidatzis D, Mohn F, Artus-Revel CG, Zavolan M, Svoboda P, Filipowicz W 2008. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol.*, 15(3), 259-67.

Sonoda Y, Yokosawa M, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M and Tominaga T (2010). O(6)-Methylguanine DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression is correlated with progression-free survival in patients with glioblastoma. *Int J Clin Oncol* 15: 352-358.

Sontheimer H (2003). Malignant gliomas: perverting glutamate and ion homeostasis for selective advantage. *Trends Neurosci* 26: 543-549.

Sontheimer H (2008). A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J Neurochem* 105: 287-295.

Spiegel-Kreinecker S, Pirker C, Filipits M, Lötsch D, Buchroithner J, Pichler J, Silye R, Weis S, Micksche M, Fischer J and Berger W (2010). O6-Methylguanine DNA methyltransferase protein expression in tumor cells predicts outcome of temozolomide therapy in glioblastoma patients. *Neuro Oncol* 12: 28-36.

Stiles CD and Rowitch DH (2008). Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron* 58: 832-846.

Stott F. J., S. Bates et al. 1998. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J*, 17(17), 5001-14.

Stupp R, Gander M, Leyvraz S and Newlands E (2001). Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumors. *Lancet Oncol* 2: 552-560.

Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH 2007. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 1, 515-528.

Swanson C.J., Bures, M, Johnson M.P, Linden A.M, Monn J.A, Schoepp D.D 2005. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4, 131-144.

Tabatabai, Ghazaleh, & Weller, Michael 2011. Glioblastoma stem cells. *Cell Tissue Res*, 343, 459-465.

Tentori L, Orlando L, Lacal P.M, Benincasa E, Faraoni I, Bonmassar E, D'Atri S, Graziani G 1997. Inhibition of O6-allylguanine DNA-alkyltransferase or poly (ADP-ribose) polymerase increases susceptibility of leukemic cells to apoptosis induced by temozolomide. *Mol Pharmacol.*, 52, 249-258.

Terzah M, Horton, Gaye, Jenkins, Debananda, Pati, Linna, Zhang 2009. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 potentiates the cytotoxic activity of temozolomide in leukaemia cells: influence of mismatch repair status and O6-methylguanine- DNA methyltransferase activity. *Mol. Cancer Ther.*, 8, 2232-2242.

Thon N, Eigenbrod S, Grasbon-Frodl EM, Lutz J, Kreth S, Popperl G, Belka C, Kretschmar HA, Tonn JC and Kreth FW (2010). Predominant influence of MGMT methylation in non-resectable glioblastoma after radiotherapy plus temozolomide. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82: 441-446.

Tondel M., G. Carlsson et al. 1996. Incidence of neoplasms in ages 0-19 y in parts of Sweden with high ¹³⁷Cs fallout after the Chernobyl accident. *Health Phys*, 71(6), 947-50.

Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Imai K, Tokino T, Shinomura Y 2009. Cancer epigenomics: implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. *Cancer Sci*.

Trizna Z, M. de Andrade et al. 1998. Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase mu and theta, N-acetyltransferase, and CYP1A1 and risk of gliomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7(6),553-5.

Tso C. L, W. A. Freije et al. 2006. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res*,66(1), 159-67.

Van Meir E. G., C. G. Hadjipanayis et al. 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*, 60(3), 166-93.

Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY and Olson JJ (2010). Exciting new advances in neuro-oncology. The avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60: 166-193.

Varney M.A., Gereau 4th R.W. 2002. Metabotropic glutamate receptor involvement in models of acute and persistent pain: prospects for the development of novel analgesics. *Curr Drug Target CNC Neurolo. Disord.*, 1, 283-296.

Verhaak R. G., K. A. Hoadley et al. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98-110.

Vescovi AL, Galli R. 2006. Reynolds BA Brain tumor stem cells. *Nat Rev Cancer*. 6: 425-436.

Vilchez R. A., C. A. Kozinetz et al. 2003. Simian virus 40 in human cancers. *Am J Med*, 114(8), 675-84.

Vinson PN, Conn PJ 2002. Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets for schizophrenia. *Neuropharmacology*. [Epub ahead of print] PMID: 21620876.

Vivanco I and Sawyers CL 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 489-501.

Yoshida Y, Tsuzuki K, Ishiuchi S and Ozawa S 2006. Serum-dependence of AMPA receptor-mediated proliferation in glioma cells. *Pathol Int* 56: 262-271.

Warner-Schmidt JL, Duman RS 2006. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*, 16, 239-249.

Weaver KD, Yeyeodu S, Cusack JC Jr, Baldwin AS Jr and Ewend MG 2003. Potentiation of chemotherapeutic agents following antagonism of nuclear factor kappa B in human gliomas. *J Neurooncol* 61: 187-196.

Wen PY and Kesari S 2008. Malignant glioma in adults. *N Engl J Med* 359: 492-507.

Woodworth G., M. J. McGirt et al. 2005. Accuracy of frameless and frame-based image-guided stereotactic brain biopsy in the diagnosis of glioma: comparison of biopsy and open resection specimen. *Neurol Res*, 27(4), 358-62.

Wrensch M., M. Yost et al. 1999. Adult glioma in relation to residential power frequency electromagnetic field exposures in the San Francisco Bay area. *Epidemiology*, 10(5), 523-7.

Wu A, Oh S, Wiesner SM et al. 2008. Persistence of CD133+ cells in human and mouse glioma cell lines: detailed characterization of GL261 glioma cells with cancer stem cell-like properties. *Neurosurgery*, 17, 173-84.

Yano H., A. Hara et al. 2000. Differential expression of beta-catenin in human glioblastoma multiforme and normal brain tissue. *Neurol Res*, 22(7), 650-6.

Yoshida T, Hazan I, Zhang J, Ng SY, Naito T, Snippert HJ, Heller EJ, Qi X, Lawton LN, Williams CJ-Georgopoulos K 2008. The role of the chromatin remodeller Mi-2beta in hematopoietic stem cell self-renewal and multilineage differentiation. *Genes Dev*, 22(9), 1174-89.

Yoshimizu T, Chaki S 2004. Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist MGS0039. *Biochem Biophys Res Commun*.

Zaidi H. A., T. Kosztowski et al. 2009. Origins and clinical implications of the brain tumor stem cell hypothesis. *J Neurooncol*, 93(1), 49-60.

Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B et al. 2008. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res*, 14, 123-9.

Zhao C, Wei D, Gage FH. 2008. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*, 132, 645-660.

Zheng T., K. P. Cantore et al. 2001. Occupational risk factors for brain cancer: a population-based case-control study in Iowa. *J Occup Environ Med*, 43(4), 317-24.

Zhou, Zhang, Damelin Geles, & Dirks. 2009. Dirks Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, 8(10), 806-23.

Zhu Y, T. Harada et al. 2005. Inactivation of NF1 in CNS causes increased glial progenitor proliferation and optic glioma formation. *Development*, 132(24), 5577-88.