

Università degli studi di Milano-Bicocca

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina Sperimentale

Laboratorio di Patologia Generale

Corso di Dottorato in Tecnologie Biomediche (Ciclo XXII)



**ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE
STAMINALI ADULTE DA RENE NORMALE E
CARCINOMA RENALE**

Coordinatore: Prof.ssa Marina Del Puppo

Tutore: Dott.ssa Cristina BIANCHI

Co-Tutore: Prof. Roberto Perego

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Silvia BOMBELLI

Matricola 044981

Anno accademico 2008-2009

INDICE

INDICE	1
INDICE DELLE FIGURE E DELLE TABELLE	3
ELENCO ABBREVIAZIONI	5
RIASSUNTO	6
INTRODUZIONE	11
CARCINOMA RENALE (RCC)	11
Sottotipi istologici del RCC	11
Carcinoma renale a cellule chiare	12
Carcinoma renale papillare	17
Carcinoma renale cromofobo	18
Carcinoma renale che origina dal dotto collettore	18
Terapia e fattori prognostici del RCC	19
LE CELLULE STAMINALI	19
Le cellule staminali adulte.....	20
Divisioni cellulari e self-renewal.....	21
La nicchia.....	22
Le cellule staminali tumorali	23
Tecniche di isolamento di cellule staminali tumorali.....	26
LE CELLULE STAMINALI NELLE PATOLOGIE RENALI	28
Cellule staminali normali e tumorali nel rene.....	29
SCOPO DELLA RICERCA	32
RISULTATI	34
ALLESTIMENTO E COLTURA DI NEFROSFERE DA TESSUTO RENALE NORMALE E CARCINOMA RENALE	34
CLONALITÀ DELLE NEFROSFERE	35
CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELLE NEFROSFERE	37
Le nefrosfere contengono cellule con proprietà staminali.....	37
Valutazione dell'espressione di marcatori renali nelle nefrosfere	38

Valutazione dell'espressione di marcatori di staminalità nelle nefrosfere	41
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLE NEFROSFERE.....	43
PROVE DI DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE DERIVANTI DALLE NEFROSFERE NORMALI..	49
Differenziamento epiteliale	49
Generazione in vitro di strutture tridimensionali	50
Differenziamento neuronale.....	51
ISOLAMENTO DELLE CELLULE STAMINALI RENALI ADULTE NORMALI.....	55
MATERIALI E METODI	58
CASISTICA	58
PREPARAZIONE DI SOSPENSIONI A SINGOLE CELLULE DA CAMPIONI DI RENE NORMALE E TUMORALE.....	59
ALLESTIMENTO DI COLTURE PRIMARIE EPITELIALI DERIVANTI DA RENE NORMALE E CARCINOMA RENALE	60
COLORAZIONE CON PKH	60
COLTURA DI NEFROSFERE	61
IMMUNOFUORESCENZA.....	62
ANALISI IMMUNOFENOTIPICA TRAMITE FACS	63
ESTRAZIONE DI RNA MEDIANTE TRIZOL [®]	64
SINTESI DI CDNA.....	65
REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION	65
TaqMan low density array (TLDA).....	67
Analisi delle TLDA.....	68
PROVE DI DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE OTTENUTE DA SFERE NORMALI	69
Differenziamento epiteliale	69
Formazione in vitro di strutture tridimensionali.....	70
Differenziamento neuronale.....	70
SORTING DI CELLULE COLORATE CON PKH.....	70
DISCUSSIONE	72
BIBLIOGRAFIA	80
RINGRAZIAMENTI	89

INDICE DELLE FIGURE E DELLE TABELLE

Figura 1: Sezione istologica di un carcinoma renale a cellule chiare	13
Figura 2: Ruolo di VHL.....	16
Figura 3: Sezione istologica di un carcinoma renale papillare.	17
Figura 4: Sezione istologica di un carcinoma renale cromofobo.	18
Figura 5: Valutazione dell'origine clonale delle nefrosfere	36
Figura 6: Razionale all'uso del colorante PKH26 per dimostrare la presenza di cellule quiescenti nella popolazione cellulare in studio	37
Figura 7: Analisi in contrasto di fase e fluorescenza di nefrosfere renali normali e tumorali colorate con PKH26	38
Figura 9: Espressione di Citocheratina.....	40
Figura 10: Espressione di marcatori renali nelle colture primarie e nelle nefrosfere ottenute da tessuto renale tumorale.....	41
Figura 11: Espressione di marcatori staminali valutata mediante FACS nelle colture primarie e nelle nefrosfere ottenute da tessuto renale normale	42
Figura 12: Espressione di marcatori staminali valutata mediante FACS nelle colture primarie e nelle nefrosfere ottenute da tessuto renale tumorale....	43
Figura 13: Rappresentazione colorimetrica dell'espressione dei 36 geni risultati statisticamente significativi nei campioni analizzati	45
Figura 14: Rappresentazione colorimetrica dell'espressione dei 23 geni trovati overespressi significativamente nelle sfere rispetto alle colture primarie. ..	48
Figura 15: Immagini in contrasto di fase delle cellule coltivate in condizioni che favoriscono il differenziamento epiteliale.....	49
Figura 16: Analisi immunofenotipica tramite FACS della composizione cellulare delle colture derivanti Da tessuto renale normale e dalle nefrosfere normali differenziate verso un fenotipo epiteliale	50

Figura 17: Formazione di strutture tridimensionali di aspetto tubulare e glomerulare in substrati semisolidi come Collagene di tipo I e Matrigel..	51
Figura 18: Immagini in contrasto di fase delle cellule derivanti da nefrosfere normali coltivate in condizioni di differenziamento neuronale.....	52
Figura 19: Valutazione del marcatore epiteliale e di marcatori neuronali su cellule derivate dalle nefrosfere e differenziate verso un fenotipo neuronale e epiteliale.....	53
Figura 20: a) analisi al FACS delle cellule che costituiscono le nefrosfere normali; b) identificazione e separazione delle tre popolazioni PKH; c) coltura delle tre popolazioni separate.....	56
Figura 21: Protocollo di allestimento e coltura di nefrosfere da tessuto renale normale e carcinoma renale	62
Figura 22: Rappresentazione schematica del funzionamento delle sonde Taqman.....	66
Figura 23: TaqMan low density array	67
Figura 24: Pathways di mantenimento della pluripotenza nelle cellule staminali embrionali. In evidenza la β -catenina, coinvolta nel pathway di Wnt, Nanog e Oct4, tutti overespressi nelle nostre nefrosfere	76
Tabella 1: Efficienza di formazione delle sfere primarie e secondarie normali e tumorali (media \pm SD) e numero di cellule per sfera nei diversi passaggi (media \pm SD).....	35
Tabella 3: Elenco dei geni differenzialmente espressi tra sfere normali (NK) e sfere tumorali (RCC) con i valori di significatività statistica.....	46
Tabella 4: Elenco dei geni statisticamente overespressi nelle sfere, normali (NK) o tumorali (RCC), rispetto le colture primarie corrispondenti e dei geni statisticamente overespressi nelle colture primarie normali (NK) e tumorali (RCC) rispetto alle sfere corrispondenti.....	47
Tabella 5: Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti affetti da RCC arruolati nella casistica e esito dell'allestimento di "nefrosfere".	58
Tabella 6: Elenco dei 96 geni contenuti nelle TLDA utilizzate.	68

ELENCO ABBREVIAZIONI

EGF: Epidermal growth factor
EMT: Transizione epiteliale-mesenchimale
FGF: Fibroblast growth factor
HIF: Fattore inducibile dell'ipossia
ICM: Inner cell mass
LAM: Laminina
MAP: Proteina associate ai microtubuli
NK: Rene normale
RCC: Carcinoma a cellule renali
RCCcc: Carcinoma renale a cellule chiare
RCCcr: Carcinoma renale cromofobo
RCCp: Carcinoma renale papillare
SFE: Efficienza di formazione delle sfere
TLDA: TaqMan low density array
VHL: Von Hippel-Lindau
 α -SMA: alpha smooth muscle actin

RIASSUNTO

La letteratura suggerisce che la rigenerazione di cellule epiteliali tubulari sia il meccanismo di riparazione predominante in seguito a danno tubulare ischemico nel rene adulto di mammifero [Humphreys, 2008] e che questo meccanismo di riparazione sia indipendente da qualsiasi contributo da parte di cellule staminali [Duffield, 2005]; nonostante ciò l'esistenza di una cellula staminale renale adulta residente è ancora dibattuta. Diversi gruppi hanno spesso ottenuto risultati discordanti e l'identità di una cellula staminale renale non è ancora stata esaurientemente descritta [Alison, 2009].

Negli ultimi anni sono state descritte inoltre popolazioni di "cellule staminali tumorali" in molti tumori chiamate anche "cellule inizianti il tumore" o "cellule tumorali tumorigeniche". Queste si riferiscono ad una sottopopolazione di cellule tumorali che ha la capacità di auto-rinnovarsi e generare i diversi tipi cellulari di cui il tumore è composto. Le informazioni circa una cellula staminale tumorale del carcinoma renale sono scarse e l'identificazione di una tale popolazione potrebbe essere utile per sviluppare nuove ipotesi patogenetiche e nuove terapie specifiche nei confronti di queste cellule staminali tumorali che potrebbero rappresentare una valida alternativa all'intervento chirurgico, ad oggi ancora l'unico valido presidio terapeutico.

Il carcinoma renale rappresenta il 3% delle neoplasie maligne dell'adulto ed è tra le 10 neoplasie più comuni nell'adulto in Europa. E' caratterizzato da diversi sottotipi istologici, tra cui il carcinoma renale a cellule chiare che rappresenta circa l'80% dei casi. Tale neoplasia è caratterizzata da una prognosi quasi sempre severa in quanto la diagnosi è spesso tardiva e il tumore è resistente a chemio o radio terapia [Kopper 2006; Motzer 2007; Escudier 2007].

Gli unici lavori presenti in letteratura che descrivono l'identificazione di progenitori nel rene umano adulto e nel carcinoma renale si basano sull'utilizzo di marcatori di superficie non sempre attendibili in quanto identificano una popolazione eterogenea e non sono sempre in grado di discriminare tra cellule staminali e progenitori. Inoltre non è chiaro se le

cellule da loro identificate siano progenitori mesenchimali derivanti dal midollo osseo migrati ed insediati nel rene oppure cellule residenti renali. Risulta quindi necessario indagare l'esistenza di una popolazione staminale renale utilizzando anche metodiche differenti rispetto a quelle già descritte in letteratura.

Per l'isolamento di cellule staminali da rene normale e carcinoma renale è stato da noi utilizzato, come descritto in questa tesi, un approccio funzionale che si basa sulla coltivazione della sospensione di cellule singole, ottenuta da tessuto normale e tumorale, a bassa densità, in assenza di siero, in condizioni non aderenti e con opportuni fattori di crescita (EGF, FGF2 e B27). La maggior parte delle cellule va incontro a morte in queste condizioni di coltura e solamente una piccola percentuale di cellule, circa lo 0,7% per il tessuto normale e circa 1% per il tessuto tumorale, sopravvive in coltura formando aggregati sferici in sospensione, da noi chiamate "nefosfere". Questa piccola percentuale di cellule rappresenta la popolazione staminale che è in grado di rigenerare sfere mantenendo la stessa efficienza nei diversi passaggi in coltura, come prova di self-renewal, e che può essere mantenuta per molti mesi in coltura. Utilizzando i coloranti lipofilici fluorescenti PKH è stata dimostrata l'origine clonale delle nefrosfere e anche la presenza all'interno di esse di una popolazione eterogenea. Il colorante infatti si diluisce nelle cellule in attiva replicazione mentre è ritenuto nelle cellule quiescenti; infatti all'interno delle nefrosfere normali e tumorali abbiamo osservato cellule più intensamente fluorescenti, che sono le staminali quiescenti, e cellule meno intensamente fluorescenti o non fluorescenti del tutto, che sono i progenitori in attiva replicazione. I marcatori di differenziamento epiteliale e tubulare, valutati tramite immunofluorescenza su vetrino dopo citospin, risultano espressi sulle nefrosfere normali e tumorali in modo non omogeneo; solamente le cellule meno PKH fluorescenti esprimono ad esempio il marcatore epiteliale Citocheratina, a dimostrazione del fatto che le cellule in attiva proliferazione sono già indirizzate verso un fenotipo differenziato, mentre le cellule più intensamente PKH fluorescenti mantengono il loro stato indifferenziato. Inoltre 16 geni correlati con la staminalità o coinvolti nel mantenimento dello stato indifferenziato e della pluripotenza, come Nanog e Oct4, risultano

overespressi nelle nefrosfere normali e tumorali rispetto alle colture primarie differenziate derivate dallo stesso paziente. Questo risultato è una prova del fatto che le nefrosfere contengono cellule in cui sono attivati i pathway in grado di mantenere il fenotipo staminale.

Abbiamo valutato inoltre le capacità differenziative delle cellule derivanti dalle nefrosfere normali utilizzando condizioni di coltura specifiche. Le cellule derivanti dalle nefrosfere normali sono in grado di differenziare verso un fenotipo epiteliale, valutabile sia dalla morfologia poligonale che dall'espressione dei comuni marcatori epiteliali e tubulari. Inoltre le stesse cellule cresciute in substrati semisolidi, quali collagene di tipo I e Matrigel, e in presenza di siero sono in grado di formare strutture tridimensionali simili a tubuli e glomeruli di diverse dimensioni. Da questi esperimenti in vitro si può concludere che le cellule derivanti dalle nefrosfere normali sono in grado di originare alcuni dei fenotipi cellulari presenti nel nefrone e quindi potrebbero potenzialmente rigenerare un tessuto renale danneggiato in seguito a danno tubulare in vivo.

Inoltre le capacità di plasticità delle cellule che compongono le nefrosfere normali sono state valutate coltivandole in un terreno che ne induce il differenziamento in senso neuronale. Le cellule hanno mostrato un rallentamento della crescita rispetto al fenotipo epiteliale e dopo alcuni giorni in coltura lo sviluppo dei prolungamenti che terminano con dei peduncoli. Tale morfologia potrebbe essere associata ad un fenotipo neuronale ma anche podocitario; è infatti noto dalla letteratura che questi due tipi cellulari condividono molteplici proprietà. La morfologia di queste cellule è stata meglio caratterizzata attraverso esperimenti di immunofluorescenza su vetrino utilizzando marcatori citoscheletrici che meglio evidenziano i prolungamenti. Inoltre i marcatori neuronali MAP2 e NF200 sono espressi solamente dalle cellule differenziate verso il fenotipo neuronale e non da quelle differenziate verso il fenotipo epiteliale. La potenziale capacità di queste cellule di differenziare verso un fenotipo podocitario, se confermata da ulteriori indagini, e anche quella di rigenerare il tessuto renale in seguito ad un danno glomerulare potrebbe avere grandi implicazioni nella medicina rigenerativa, in quanto le patologie a carico del

glomerulo sono ad oggi le più diffuse tra le patologie renali e quelle che più frequentemente portano il paziente alla dialisi e in seguito al trapianto renale.

Avendo quindi dimostrato che nefrosfere ottenute da tessuto renale normale e tumorale contengono cellule staminali in grado di autorinnovarsi, che esprimono ad alti livelli i geni coinvolti con il mantenimento dello stato indifferenziato e, nel caso delle nefrosfere normali, in grado di differenziare in tipi cellulari diversi, abbiamo anche messo a punto un protocollo che permette di isolare tali cellule dalle nefrosfere. Sono state identificate tre diverse popolazioni cellulari nelle nefrosfere normali sulla base dell'intensità di fluorescenza del PKH: una popolazione con un elevato livello di fluorescenza, una popolazione con una fluorescenza bassa e una popolazione negativa. Tutte le popolazioni sono state isolate mediante *cell sorting* e coltivate in condizioni non aderenti, in assenza di siero e con gli opportuni fattori di crescita per formare nefrosfere. Solamente la popolazione che mostrava un elevato livello di fluorescenza ha rigenerato le sfere con alta efficienza, a dimostrazione che questa è la popolazione cellulare quiescente e l'unica con proprietà di self-renewal. Questi risultati sono preliminari alla ulteriore caratterizzazione di questa componente staminale delle nefrosfere normali.

Nel proseguo di questi studi le cellule staminali tumorali isolate dalle nefrosfere tumorali saranno caratterizzate, in termini di capacità tumorigeniche in vivo, iniettando le stesse in topi immunodepressi e saranno inoltre trattate con farmaci antineoplastici per valutare la loro risposta a nuove terapie. Le cellule staminali normali isolate dalle nefrosfere normali saranno invece caratterizzate valutando la capacità di differenziare in molteplici fenotipi in vitro e di rigenerare il tessuto renale in vivo in seguito a danno tubulare o glomerulare in topi immunodepressi. Dalle cellule staminali normali e tumorali isolate dalle nefrosfere sarà poi estratto l'RNA e effettuata un'analisi trascrittomico per definire l'esatto fenotipo staminale renale e per valutare le differenze tra le staminali normali e tumorali. I risultati di questa analisi fenotipica verranno poi utilizzati per individuare mediante tissue

microarray la localizzazione di queste cellule staminali all'interno del tessuto e per caratterizzare le nicchie staminali in cui risiedono.

Le applicazioni nel campo della medicina rigenerativa per le patologie renali tubulari o glomerulari che potrebbero seguire allo sviluppo del progetto descritto in questa tesi sono notevoli; inoltre un'approfondita caratterizzazione delle cellule staminali tumorali potrà portare allo sviluppo di nuove ipotesi patogenetiche per il carcinoma renale e la definizione delle differenze tra cellule staminali renali normali e tumorali potrà portare allo sviluppo di nuovi marcatori diagnostici e prognostici del carcinoma renale e di nuove terapie specifiche.

INTRODUZIONE

CARCINOMA RENALE (RCC)

Il carcinoma renale (RCC) rappresenta circa il 3% di tutte le neoplasie maligne dell'adulto ed è la più comune forma di tumore renale; è una neoplasia eterogenea costituita da vari sottotipi istologici che hanno caratteristiche fenotipiche e genetiche diverse. Nel 2007, in America è stato registrato un aumento dell'incidenza del carcinoma renale con circa 51190 nuovi casi e 12890 decessi [American Cancer Society, 2007]. Il picco di incidenza si ha tra la sesta e la settima decade d'età e i maschi sono leggermente più colpiti delle donne con un rapporto di 1.6:1.0 [Jamel, 2005].

Il carcinoma renale ha una sintomatologia estremamente scarsa e per questo nel 50% dei casi viene diagnosticato casualmente ed in fase avanzata [Martel, 2003]. A partire dagli anni '70 si è verificato un continuo e costante aumento (circa 3% all'anno) dell'incidenza di questa neoplasia, in parte dovuta allo sviluppo delle tecniche di imaging che permettono una diagnosi del tumore in fase pre-clinica. Tuttavia si è riscontrato anche un parallelo aumento sia della frequenza di tumori in fase avanzata che della mortalità complessiva [Chow, 1999].

Sottotipi istologici del RCC

La definizione di carcinoma renale comprende differenti neoplasie che provengono da porzioni distinte del nefrone, ciascuna con proprie caratteristiche istologiche con un decorso clinico e risposta alla terapia diversi [Novick, 2007].

Il sistema di classificazione dei carcinomi a cellule renali, proposto in origine da Heidelberg nel 1996, identificava in ordine di frequenza i seguenti sottotipi istologici: convenzionale o a cellule chiare (RCCcc) 70-80%, papillare (RCCpap) 10-15%, cromofobo (RCCcr) 4-5% e carcinoma del dotto collettore 1%. Questa classificazione riconosce per i diversi sottotipi morfologie e caratteristiche genetiche distinte [Kovacs, 1997; Storkel, 1997]. Ogni sottotipo istologico potrebbe essere caratterizzato da un profilo di espressione genica tipico

[Higgins, 2003] e l'espressione di specifici gruppi di geni potrebbe essere quindi collegata a specifici aspetti del tumore, quali l'invasività e l'angiogenesi [Rogers, 2005].

Il profilo d'espressione genica non solo potrebbe permettere una nuova sottoclassificazione di questi tumori, ma potrebbe anche aiutare ad identificare nuovi markers tumorali e nuovi potenziali target terapeutici [Rogers, 2005].

I dati di espressione genica costituiscono anche un punto di partenza per identificare eventuali proteine con un'espressione alterata, presenti nel siero o nelle urine di pazienti con carcinomi renali. Tali proteine potrebbero essere utilizzate per individuare precocemente soggetti ad alto rischio, ad esempio individui di famiglie con forme ereditarie della malattia e per monitorare le risposte alla terapia [Higgins, 2003].

Come il cancro del colon, della mammella e della prostata, anche il tumore renale può presentarsi in forma sporadica non ereditaria o in una più rara forma familiare, legata a particolari anomalie genetiche ereditate, che si presenta tipicamente come bilaterale e multifocale. Lo studio delle forme ereditarie, identificando le sequenze geniche coinvolte, ha permesso di comprendere i meccanismi di trasformazione anche delle più comuni forme sporadiche e di classificare i carcinomi renali anche in base allo status genico [Linehan, 2003].

Tecniche molecolari, come il convenzionale bandeggio G, l'analisi microsatellitare e la perdita di eterozigosità (LOH), la "Comparative Genomic Hybridization" (CGH) sono state utilizzate per identificare le alterazioni genomiche associate ai vari sottotipi istologici di RCC [Burget, 1996; Moch, 2002; Kovacs, 1993].

Carcinoma renale a cellule chiare

RCCcc è la più comune variante istologica di carcinoma renale ed origina dall'epitelio del tubulo contorto prossimale [Walsh, 2003; Kovacs, 1997]. La maggior parte dei casi di RCC a cellule chiare sono unilaterali e unifocali [Baldewijns, 2008].

Istologicamente il carcinoma a cellule chiare è composto da cellule con un citoplasma che appare chiaro, organizzato in foglietti, acini o alveoli con una prominente vascolarizzazione a pareti sottili. Il citoplasma chiaro è dovuto all'asportazione, da parte delle usuali metodiche istologiche, di lipidi che riempiono le cellule. I nuclei possono essere da rotondi a ovali e in un singolo tumore possono coesistere. Caratteristiche comuni ai tumori di grado lieve sono ialinizzazione e fibrosi, mentre nei tumori ad alto grado si può avere necrosi coagulativa [Cheville, 2003]. In alcuni casi si può osservare un misto di cellule chiare e cellule con un citoplasma più eosinofilo. Una piccola porzione di tumori a cellule chiare sono cistici [Kovacs, 1997; Storkel, 1997; Bostwick, 1999; Grignon, 2005].

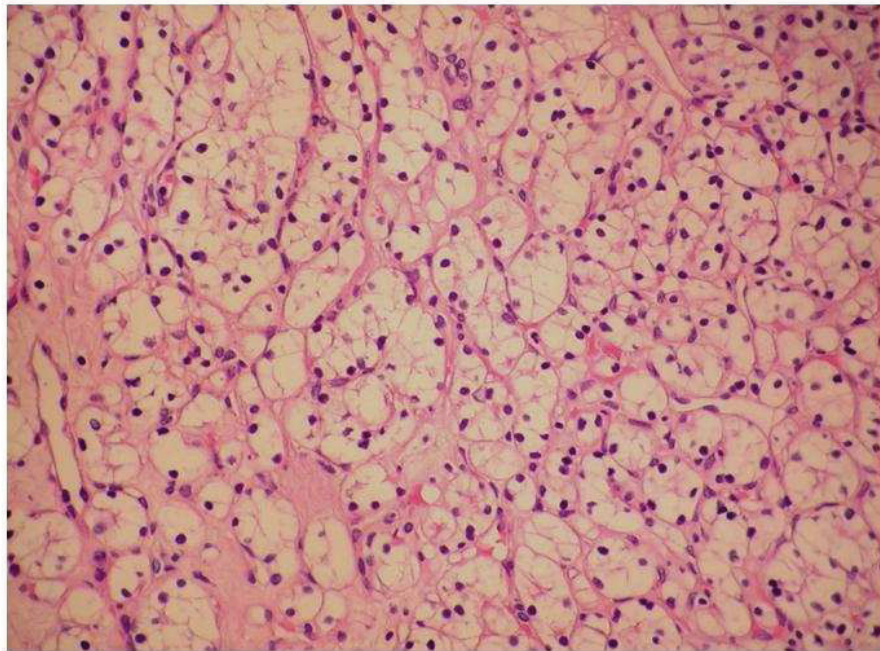


Figura1: Sezione istologica di un carcinoma renale a cellule chiare

Colorazione con ematossilina-eosina.

A livello genetico, il carcinoma renale a cellule chiare è caratterizzato da complesse alterazioni cromosomiche. Le perdite più comuni di DNA in questo tipo di tumore coinvolgono i cromosomi 3p, 4q, 6q, 13q, 14q, e Xq e la perdita del cromosoma 3q rappresenta la più comune aberrazione genetica nel tumore al rene. Delezione al 3p sono state riscontrate nel 56-61% di tumori

clear cell. Sono almeno tre le regioni sul cromosoma 3p d'interesse per studi di perdita di eterozigotità (LOH) [Moch, 2002].

La forma ereditaria del carcinoma renale a cellule chiare è quasi sempre legata alla sindrome di von Hippel-Lindau (VHL), che rappresenta una patologia con un'espressività variabile, che colpisce approssimativamente un individuo su 36000; clinicamente è caratterizzata dall'insorgenza di tumori ipervascolarizzati a livello di più organi come CNS, retina, pancreas, ghiandola surrenalica, epididimo e rene [Ohh, 2003; Crossey, 1994; Linehan, 2004]. Circa il 35 - 45% dei pazienti affetti da tale patologia sviluppano tumori renali appartenenti interamente al sottotipo istologico a cellule chiare [Linehan, 2003].

Dal punto di vista genetico la sindrome è causata da alterazioni che colpiscono e inattivano il gene VHL situato sul braccio corto del cromosoma 3 (3p25). Questo gene in base alla teoria dei 2-hit di Knudson e Strong possiede le tipiche caratteristiche del gene oncosoppressore. Infatti, l'inattivazione funzionale del gene avviene in seguito ad alterazione nei due alleli genici in due momenti distinti e successivi. I tumori VHL-associati sono determinati da una mutazione ereditata a livello della linea germinale (evento primario) seguita, durante la vita, da una seconda mutazione somatica, generalmente una delezione, a livello del secondo allele (evento tardivo) [Linehan, 2003; Crossey, 1994; Lubensky, 1996]. Un'ulteriore prova a sostegno della funzione oncosoppressoria del gene VHL nel carcinoma renale deriva da uno studio di Gnarra et al. Trasfettando una copia normale del gene VHL in una linea cellulare di CCRCC VHL-/- i ricercatori osservarono che la linea cellulare transfettata non cresceva in topi immunodepressi o formava tumori di piccole dimensioni a differenza delle linee non transfettate [Gnarra, 1996].

L'identificazione di questo "gene malattia" è stata indispensabile per la diagnosi e la terapia della sindrome VHL e soprattutto per capire la patogenesi del tumore renale a cellule chiare. Gli studi su questa proteina hanno infatti prodotto nuove informazioni sul possibile ruolo del pathway responsivo all'ipossia nella tumorigenesi [Maher, 2004]. Infatti la proteina codificata dal gene VHL possiede un ruolo non ancora del tutto chiaro, ma sicuramente interviene in molte e importanti funzioni cellulari come: la

risposta cellulare all'ipossia, il controllo intracellulare del pH, la glicolisi, il trasporto del glucosio, la produzione di TGF- β , l'interazione con la matrice extracellulare e la stabilità dell'mRNA del VEGF [Lam, 2005; Linehan, 2003]. La proteina VHL forma un complesso con due proteine chiamate Elonghina C e B, appartenenti a una famiglia di geni critici nella regolazione trascrizionale, e con una terza proteina con attività di ubiquitina-ligasi nominata Cul-2. Questo complesso proteico ha la funzione di opsonizzare la proteina HIF1- α (fattore inducibile dell'ipossia) per la sua successiva degradazione ubiquitina-mediata ad opera del proteosoma. L'HIF1 è un eterodimero formato da HIF1- α e HIF1- β ed è un fattore di trascrizione che controlla la trascrizione di numerosi geni, ad esempio quelli codificanti il VEGF, il GLUT-1, il PDGF, il TGF- α e l'eritropoietina. HIF1- β è costitutivamente espresso mentre la concentrazione intracellulare di HIF1- α è controllata. In presenza di ossigeno, il suddetto complesso proteico, a cui partecipa VHL, lega il fattore HIF1- α , che è idrossilato, e lo guida all'attacco di una catena poliubiquitina che media la sua degradazione attraverso il proteosoma (Figura 2a). In condizioni di ipossia l' HIF1- α non viene degradato e si accumula causando l'over-espressione dei geni a valle elencati prima, portando di conseguenza ad elevati livelli di VEGF, GLUT-1, PDGF, TGF- α ed eritropoietina (Figura 2b).

L'inattivazione funzionale del gene VHL (mutazioni in entrambi gli alleli) determina una situazione simile a quella che si verifica in caso di ipossia: un accumulo di HIF1- α con una persistente e continua iperproduzione di fattori di crescita come: il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), che potrebbe spiegare perché tumori come CCRCC sono altamente vascolarizzati; il trasportatore del glucosio (GLUT-1), che implementa il trasporto intracellulare di glucosio, fattori di crescita con azione autocrina quali PDGF e TGF- α . L'azione protratta nel tempo dei fattori di crescita locali potrebbe favorire la trasformazione neoplastica delle cellule tubulari [Linehan, 2003; Lam, 2005; Leppert, 2006].

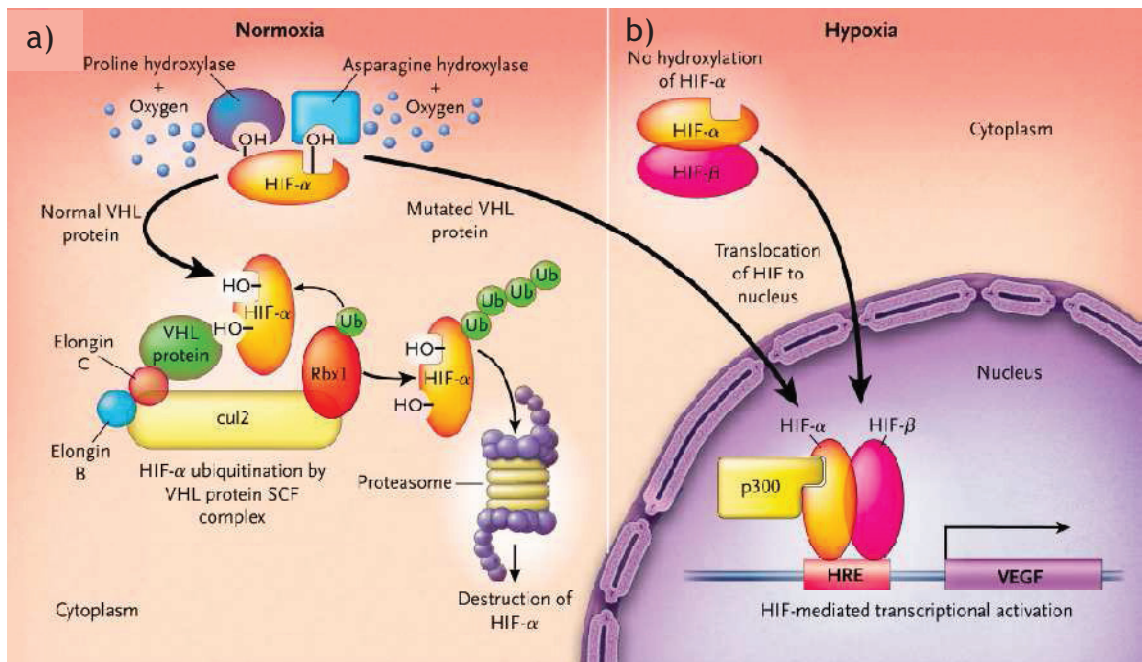


Figura 2: Ruolo di VHL

Oltre al gene di von Hippel-Lindau al 3p25, esistono altri geni candidati ad un'attività antioncogena nel RCCcc mappati sul cromosoma 3: il gene per la triade istidina fragile (FHIT) al 3p14.2, il gene della proteina 1 della famiglia dei domini associati a RAS (RASSF1A) al 3p21.3 e il gene della β-catenina (hMLHI) [Dal Cin, 2003; Bodmer, 2002]. Finora per il gene oncosoppressore di von Hippel-Lindau è stata dimostrata una stretta relazione causale anche con l'insorgenza di CCRCC sporadico. Infatti una inattivazione somatica di VHL è stata trovata in oltre il 57% dei casi sporadici [Storkel, 1997; Gnarra, 1994] e un'ipermetilazione della regione promotrice VHL è stata osservata in oltre il 19% dei casi [Yoshida, 2002]. L'intuizione che alterazioni a livello del braccio corto del cromosoma 3 possano portare alla perdita funzionale di geni oncosoppressori, responsabili dello sviluppo tumorale, ha stimolato la ricerca di alterazioni genetiche, per esempio la perdita di eterozigotà in sequenze microsatellitari, quali possibili parametri utili per evidenziare una precoce presenza del tumore.

Carcinoma renale papillare

Il carcinoma renale papillare origina dall'epitelio del tubulo contorto prossimale e tumori bilaterali e multifocali sono più frequenti in questo sottotipo di RCC rispetto agli altri [Baldewijns, 2008]. Il RCCp è stato sottoclassificato a sua volta, sulla base di caratteristiche istopatologiche e genetiche, in un tipo 1 e in un tipo 2. Istologicamente, il tipo 1 è composto da un cuore fibrovascolare delineato da un singolo strato di cellule piccole cuboidali con scarso citoplasma chiaro, con piccoli nuclei ovali e nucleoli non distinguibili, mentre il tipo 2 è formato da papille con un epitelio pseudo stratificato con cellule caratterizzate da un citoplasma eosinofilo più abbondante, con nuclei sferici più larghi e nucleoli ben distinti [Delahunt, 1997; Moch, 2002; Cohen, 2005; Baldewijns, 2008]. In alcuni tumori, le cellule contengono abbondanti pigmenti di emosiderina. Alcuni tumori papillari sono composti da tubuli piuttosto che da papille distinte. Il cuore centrale fibrovascolare spesso contiene macrofagi carichi di lipidi, corpi "psammoma" e fluido edematoso [Kovacs, 1997; Storkel, 1997; Bostwick, 1999; Cheville, 2003; Delahunt, 1997].

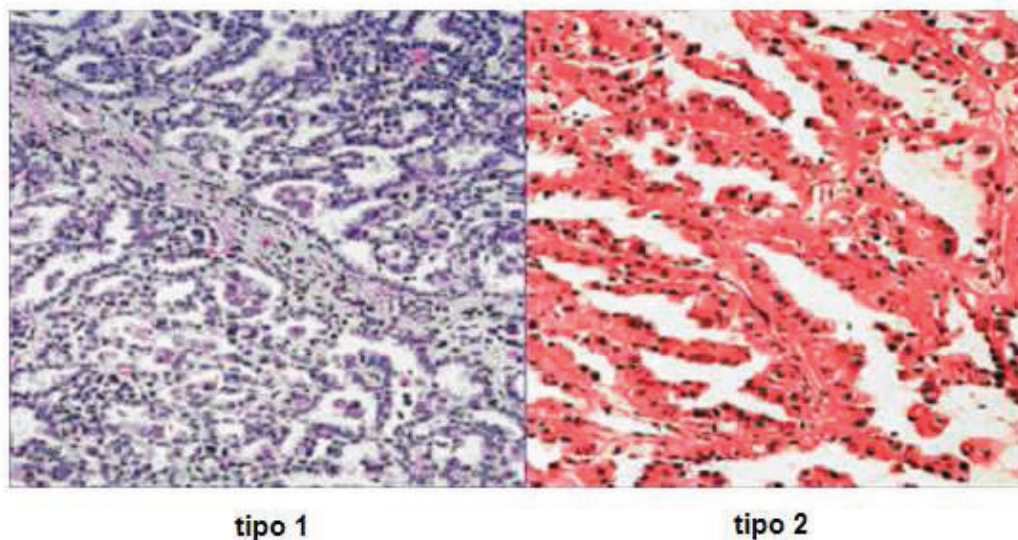


Figura 3: Sezione istologica di un carcinoma renale papillare.

Colorazione ematossilina-eosina.

Carcinoma renale cromofobo

Il carcinoma cromofobo (RCCcr) origina dall'epitelio del tubulo distale e istologicamente è composto da ampi foglietti formati da cellule con citoplasma eosinofilo e citoplasma chiaro, arrangiate lungo un fine setto vascolare. Le cellule hanno nuclei irregolari con dimensione variabile. Il citoplasma contiene numerose microvescicole e tende a condensarsi vicino alla membrana cellulare, formando un alone attorno al nucleo. Necrosi ed emorragie non sono frequenti, ma sono comunque presenti in una minoranza di tumori [Kovacs, 1997; Storkel, 1997; Bostwick, 1999].

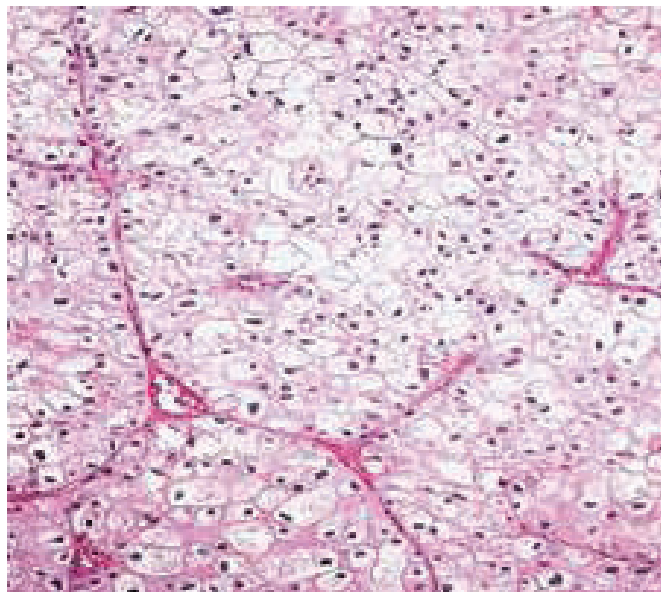


Figura 4: Sezione istologica di un carcinoma renale cromofobo.

Colorazione con ematossilina-eosina.

Carcinoma renale che origina dal dotto collettore

Il carcinoma renale che origina dal dotto collettore ha un'istologia variabile ed è composto da canali irregolari, delineati da un epitelio atipico costituito da un singolo strato di cellule cuboidali con una forma a “chiodo”. Lo stroma può essere fibrotico, desmoplastico o infiammato. I tubuli renali adiacenti che circondano il carcinoma del dotto collettore potrebbero mostrare cambiamenti displastici [Kovacs, 1997; Storkel, 1997; Bostwick, 1999; Cheville, 2003].

Terapia e fattori prognostici del RCC

L'RCC è una delle neoplasie maligne maggiormente resistenti alla terapia, infatti risponde molto poco o per niente a chemioterapia, terapia ormonale e radioterapia [Amato, 2000], la chirurgia rimane perciò il principale metodo di trattamento dell'RCC, sebbene sia efficace solo in circa il 70% degli RCC allo stadio iniziale e localizzati [Russo, 2000]. La prognosi di RCC è basata principalmente sullo stadio clinico e sul grado patologico della malattia, ma anche il sottotipo istologico ha valore prognostico. Pazienti con RCCcc hanno una prognosi peggiore rispetto ai pazienti con RCCp o RCCcr [Amin, 2002; Higgins, 2003]. Le caratteristiche cliniche, chirurgiche e patologiche, infatti, risultano significativamente differenti fra i tre sottotipi, per esempio, pazienti con RCCcc presentano tumori con stadio e grado più alto e maggior formazione di metastasi al momento della nefrectomia rispetto ai pazienti con carcinoma di tipo papillare e cromofobo. Inoltre, vi sono differenze tra i differenti sottotipi di RCC per quanto riguarda l'andamento clinico successivo all'intervento chirurgico [Cheville, 2003].

LE CELLULE STAMINALI

Una cellula staminale è una cellula primitiva che è in grado di dividersi per generare una cellula identica alla cellula madre (auto rinnovamento o *self-renewal*) oppure per dare origine ad una cellula più specializzata (differenziata) [Verfaille, 2002]. Le cellule staminali possiedono potenzialità differenti: solamente l'ovocita fecondato, cioè lo zigote, e le cellule derivanti dalle prime due divisioni sono *totipotenti*, capaci di dare origine all'embrione e al trofoblasto della placenta. Dopo circa quattro giorni queste cellule totipotenti iniziano a specializzarsi, formando una sfera cava di cellule, la blastocisti, e una massa di cellule, chiamata *inner cell mass* (ICM), dalla quale si sviluppa l'embrione. Le cellule della ICM sono considerate *pluripotenti*, capaci di differenziare in quasi tutte le cellule che derivano dai tre foglietti embrionali, ma non sono in grado di dare origine all'embrione perchè sono incapaci di originare la placenta e i tessuti di supporto; queste cellule

staminali pluripotenti sono anche chiamate cellule staminali embrionali. Nella maggior parte dei tessuti dell'organismo adulto risiedono cellule staminali *multipotenti*, capaci di differenziare in una serie limitata di fenotipi cellulari; queste vengono chiamate cellule staminali adulte [Alison, 2009].

Le cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte sono una componente essenziale dell'omeostasi tissutale; sostengono la rigenerazione tissutale, sostituendo le cellule perse in seguito ad apoptosi o a un danno. Per sostenere questa funzione durante l'intera vita dell'individuo, deve essere mantenuto un delicato equilibrio tra *self-renewal* e differenziamento. I meccanismi che controllano questo delicato equilibrio sono fondamentali per capire la regolazione delle cellule staminali, la patogenesi dei tumori e il potenziale utilizzo terapeutico delle cellule staminali nelle patologie umane.

Recenti progressi nella ricerca sulle cellule staminali hanno aperto nuove porte offrendo la possibilità di utilizzare queste cellule indifferenziate o la loro progenie differenziata nella medicina sostitutiva rigenerativa e nelle terapie tumorali. Tutte le cellule staminali o progenitori sono caratterizzati da una capacità illimitata di autorinnovamento e sono capaci di dare origine a tutti i tipi cellulari maturi che compongono un tessuto adulto. Inoltre, alcuni tipi di cellule staminali, in particolare le cellule staminali che derivano dal midollo osseo, possono essere reclutate da siti periferici extramidollari in seguito ad un danno massiccio e possono partecipare alla riparazione del tessuto rimodellando e rigenerando le aree danneggiate. La stimolazione in vivo di cellule staminali adulte residenti o l'utilizzo della loro progenie espansa e differenziata ex-vivo sta diventando un approccio promettente per terapie cellulari e ingegneria tissutale [Mimeault, 2008; Bajada, 2008; Stocum, 2008].

Conoscere le caratteristiche specifiche di ogni cellula staminale adulta residente nei tessuti risulta fondamentale per la formulazione di approcci terapeutici basati sulla terapia cellulare che vadano a trattare particolari disturbi degenerativi. Sono inoltre necessarie ricerche per individuare il

pattern di espressione genica di queste cellule staminali adulte confrontate con la loro progenie differenziata per identificare biomarcatori specifici. Inoltre, l'identificazione di fattori intrinseci ed estrinseci che regolano il destino tra self-renewal e differenziamento, così come l'influenza di segnali extracellulari provenienti dalle zone in cui le cellule staminali adulte risiedono, ossia le nicchie, sul comportamento delle cellule staminali in vivo risulta di enorme interesse per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. La caratterizzazione delle proprietà biologiche delle cellule staminali adulte, dei progenitori espansi ex vivo e della progenie differenziata in modelli animali necessita studi approfonditi.

Divisioni cellulari e self-renewal

Le cellule staminali adulte esistono solitamente in uno stato quiescente e raramente vanno incontro a divisioni cellulari. Tuttavia, ad ogni ciclo cellulare una cellula staminale può dare origine mediante una divisione asimmetrica ad una cellula identica a se stessa che garantisce la propagazione del compartimento staminale (*self-renewal*), che a sua volta sostiene la morfogenesi, la riparazione dei tessuti e il mantenimento dell'omeostasi, e ad una cellula che seguirà un processo irreversibile di differenziamento attraverso una serie di cicli di divisioni cellulari (*commitment*) [Verfaillie, 2002]. Questo meccanismo di divisione cellulare è molto importante perché tiene in considerazione sia la capacità autorigenerativa delle cellule staminali, sia le loro capacità differenziate, ma non spiega la capacità delle cellule staminali di espandersi in numero. Esiste infatti un'ulteriore strategia di *self-renewal* che viene attivata per permettere l'espansione del numero delle cellule staminali quando il compartimento di queste deve essere ripristinato in seguito a lesioni. Infatti, il pool di staminali può essere arricchito e nuove cellule possono essere generate mediante divisioni simmetriche, grazie alle quali nessuna delle due cellule figlie viene indirizzata verso la produzione di progenitori *committed*, ossia indirizzati verso una specifica linea differenziativa [Morrison, 2006].

Esistono due principali meccanismi che regolano la divisione asimmetrica delle cellule staminali adulte [Betschinger, 2004; Clevers, 2005; Yamashita,

2005]. Il primo, intrinseco, si basa sulla partizione asimmetrica dei compartimenti cellulari che determineranno il destino delle cellule figlie e sull'assemblamento regolato di fattori di polarità durante la divisione cellulare. Un importante esempio di questo meccanismo è rappresentato dallo zigote di *C. elegans*, che si divide asimmetricamente per produrre un blastomero più grande che darà origine all'ectoderma e un blastomero più piccolo che produrrà, mediante altre divisioni asimmetriche, mesoderma, endoderma, e linea germinale. Il secondo, estrinseco, è il risultato della differente posizione delle due cellule figlie rispetto alla nicchia staminale a causa dello specifico orientamento del fuso mitotico in risposta a fattori interni ed esterni. Questo può determinare per le cellule figlie due destini differenti in risposta a differenti segnali provenienti dall'esterno nonostante la divisione sia intrinsecamente simmetrica [Morrison, 2006]. Le cellule staminali, quindi, sono definite dal loro potenziale di generare sia altre cellule staminali che cellule differenziate e questa loro facoltà di dividersi sia in modo asimmetrico che simmetrico potrebbe essere la chiave per le capacità rigenerative nell'organismo adulto.

E' stato osservato che molte cellule staminali nei mammiferi passano da divisioni prevalentemente simmetriche che espandono il pool delle staminali durante lo sviluppo embrionale, a divisioni prevalentemente asimmetriche durante le fasi finali della gestazione, in cui aumenta il numero di cellule differenziate. Nell'adulto è stato dimostrato che in condizioni normali, le cellule staminali si dividono in modo asimmetrico per mantenere le dimensioni della popolazione costanti. Tuttavia, la capacità di dividersi in modo simmetrico non è persa e viene attivata in risposta alla deplezione del compartimento staminale in seguito a lesioni o patologie. Non è da escludere però che le divisioni simmetriche che si osservano in questi casi siano a carico dei progenitori: solamente un'identificazione più accurata delle cellule staminali adulte potrà confermare questa ipotesi.

La nicchia

Le cellule staminali adulte sono localizzate in zone spazialmente distinte nel tessuto, chiamate nicchie, composte da cellule di supporto e microambiente extracellulare. La nicchia è stata descritta per la prima volta come

microambiente fisiologicamente limitato che supporta le cellule staminali da Schofield nel 1978 per gli studi, in vivo e in vitro, sul sistema ematopoietico. Diversi studi sulla linea germinale di *Drosophila* hanno evidenziato alcune importanti caratteristiche della nicchia che assicurano il controllo del comportamento delle cellule staminali [Yamashita, 2005]. Queste caratteristiche sono state descritte anche per le nicchie identificate in *C.elegans* e nei mammiferi nel midollo osseo, nell'intestino, nel follicolo pilifero, nel cervello e nei testicoli [Li, 2005]. La nicchia è composta da un sistema eterogeneo di cellule e ha una specifica localizzazione all'interno del tessuto. Esiste una notevole varietà nella struttura della nicchia; alcune cellule staminali si trovano relativamente isolate, come ad esempio le cellule satelliti dei muscoli. Queste, che risiedono normalmente in stato quiescente adese alla lamina basale che avvolge ogni fascio di fibre muscolari, si attivano e riacquistano le loro capacità proliferative solamente quando le fibre muscolari, danneggiate in seguito a lesioni, necessitano di riparazione. Al contrario, nei tessuti che subiscono un continuo turnover, esistono delle suddivisioni in unità, ognuna delle quali è supportata da un piccolo reservoir di cellule staminali deputate al rinnovamento del tessuto secondo le richieste fisiologiche [Fuchs, 2004]. Le cellule staminali vengono mantenute ancorate alla nicchia mediante fattori di adesione cellula-cellula, assicurando la prossimità ai segnali estrinseci per la regolazione della divisione cellulare e del self-renewal. L'organizzazione spaziale delle cellule della nicchia e delle cellule staminali in essa contenute costituisce un'importante impalcatura che favorisce le divisioni cellulari di tipo asimmetrico. Infatti, sia negli invertebrati che nei mammiferi, la nicchia ha una struttura asimmetrica che fa sì che ad ogni divisione cellulare, una cellula figlia è mantenuta nella nicchia come cellula staminale, l'altra abbandona la nicchia per proliferare e differenziare a cellula funzionalmente matura [Li, 2005].

Le cellule staminali tumorali

Negli ultimi anni sono state descritte popolazioni di "cellule staminali tumorali" in molti tumori, tra cui tumori del sangue [Bonnet, 1997], mammella [Al-Hajj, 2003], cervello [Singh, 2003] e colon [Ricci-Vitiani, 2007].

Le cellule staminali tumorali vengono anche chiamate “cellule inizianti il tumore” o “cellule tumorali tumorigeniche”. Queste si riferiscono ad una sottopopolazione di cellule tumorali che ha la capacità di auto-rinnovarsi e generare i diversi tipi cellulari di cui il tumore è composto. Questi nomi derivano dalle loro proprietà simili alle cellule staminali e dalla capacità di sostenere la tumorigenesi in modo continuo. Le cellule staminali tumorali possiedono proprietà che definiscono una cellula staminale adulta normale: auto-rinnovamento, cioè la capacità di dare origine a nuove cellule staminali con identico potenziale di proliferazione, espansione e divisione simmetrica e asimmetrica; differenziamento, cioè la capacità di dare origine ad una popolazione cellulare eterogenea [Dalerba, 2007].

L'evidenza dell'esistenza di cellule staminali tumorali deriva dal fatto che solo una piccola percentuale di cellule dalle leucemie [Bruce, 1963] e da tumori solidi eterogenei [Fidler, 1977] è clonogenica in coltura e in vivo. Per spiegare questa eterogeneità nei tumori sono stati ipotizzati due differenti modelli [Reya, 2001]:

- Modello stocastico: tutte le cellule che compongono un tumore hanno una bassa probabilità di proliferare estensivamente e comportarsi da cellula staminale tumorale in saggi clonogenici.
- Modello gerarchico o modello delle cellule staminali tumorali: la maggior parte delle cellule tumorali possiede un potenziale proliferativo limitato e non può comportarsi come cellula staminale tumorale, ma una piccola sottopopolazione definita è capace di proliferare in modo indefinito e formare tumori.

L'identificazione delle cellule staminali tumorali in diversi tumori ha portato il mondo scientifico ad interrogarsi sull'origine di queste cellule. Potrebbero derivare sia da cellule staminali normali con un fenotipo tumorale, sia da progenitori precedentemente differenziati con mutazioni in particolari oncogeni che permettono di recuperare la capacità di self-renewal, sia da rari eventi di fusione tra le cellule staminali e altre cellule [Li, 2007].

Dati recenti hanno supportato il concetto di cellula staminale tumorale metastatica. E' noto che per i tumori epiteliali la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT), che implica l'alterazione dell'omeostasi delle cellule

epiteliali a l'acquisizione di un fenotipo mesenchimale migratorio, è considerato un evento cruciale nel processo metastatico. Questo fenomeno sembra essere controllato dai pathway di TGF β e Wnt, entrambi i quali possono essere attivati in modo aberrante durante una neoplasia. Recenti lavori suggeriscono che potrebbe esistere un collegamento diretto tra il processo di EMT e l'acquisizione di proprietà staminali [Mani, 2008; Morel, 2008]. Le cellule che vanno incontro a EMT potrebbero essere i precursori delle cellule tumorali metastatiche, e forse cellule staminali tumorali metastatiche. Le cellule staminali tumorali potrebbero anche avere un ruolo nella creazione di particolari nicchie per lo sviluppo di metastasi. Infatti le cellule del tumore primario possono generare nicchie pre-metastatiche reclutando progenitori ematopoietici in nicchie tumore-specifiche [Kaplan, 2005]. Molte caratteristiche rendono le cellule staminali tumorali candidate a migrare e proliferare in luoghi estranei al tumore primario. In primo luogo, è possibile che solo le cellule staminali tumorali all'interno del tumore hanno la capacità di iniziare e sostenere la crescita tumorale ed è noto da anni che anche solo una cellula può dare origine ad una lesione metastatica. Inoltre, anche se le cellule tumorali non staminali migrassero non sarebbero in grado di proliferare in un sito esterno al tumore primario e dare origine alla metastasi. In secondo luogo, la plasticità delle cellule staminali le rende più adatte a sopravvivere in un ambiente estraneo in cui fattori di crescita e altre molecole di trasduzione del segnale sono differenti rispetto al sito del tumore primario. Inoltre, l'instabilità genetica delle cellule staminali tumorali fornisce un vantaggio selettivo nell'adattarsi in siti estranei [Li, 2007].

L'ipotesi delle cellule staminali tumorali potrebbe essere utile per capire meglio il processo di tumorigenesi e metastatico e potrebbe avere importanti implicazioni per la terapia antitumorale.

L'esistenza delle cellule staminali tumorali potrebbe spiegare il fallimento nello sviluppo di terapie capaci di eradicare i tumori solidi. Sono tre le proprietà che rendono le cellule staminali tumorali difficili da eliminare: in primo luogo sono soggette ad un efflusso di farmaci dovuto ad un'elevata espressione dei trasportatori ABC (ATP binding cassette); in secondo luogo appartengono ad una popolazione cellulare quiescente, precludendo così la

possibilità di utilizzare agenti chemoterapeutici che agiscono su cellule in attiva proliferazione; infine probabilmente sono resistenti alle radioterapie e alla conseguente apoptosi per danno cellulare.

Inoltre le cellule staminali tumorali sono molto simili alle cellule staminali adulte normali, risulta quindi critico identificare le caratteristiche tipiche che differenziano una cellula staminale tumorale da una cellula staminale normale come marcatori di superficie o differenze d'espressione di proteine coinvolte nei processi di trasduzione del segnale. L'ideale sarebbe utilizzare terapie combinate che colpiscono non solamente cellule in attiva proliferazione ma anche cellule staminali tumorali relativamente quiescenti in modo da eradicare definitivamente il tumore.

Un altro bersaglio di terapia potrebbe essere la nicchia in cui risiedono le cellule staminali tumorali. La nicchia è costituita da fibroblasti, metallo proteinasi della matrice, molecole di adesione e ligandi per i recettori delle chemochine. Se la nicchia specifica per ogni cellula staminale tumorale fosse conosciuta e descritta, potrebbero essere utilizzate come target terapeutici le differenze tra le nicchie delle cellule staminali normali e tumorali per indurre l'apoptosi o il differenziamento delle cellule staminali tumorali [Rajan, 2008]. E' stato dimostrato che molti pathway, come Wnt/ β -catenina, hedgehog, Notch e PTEN, giocano un ruolo critico nella sopravvivenza delle cellule staminali normali e tumorali. Terapie specifiche rivolte a questi pathway nelle cellule staminali tumorali potranno rappresentare approcci possibili per il trattamento di neoplasie negli anni futuri [Zaho, 2008].

Tecniche di isolamento di cellule staminali tumorali

La dimostrazione più convincente dell'esistenza e dell'identità delle cellule staminali tumorali deriva da esperimenti di trapianti seriali di popolazioni cellulari in modelli animali. Una popolazione contenente cellule staminali tumorali dovrebbe essere in grado di ricostituire l'eterogeneità fenotipica evidente nel tumore primario ed esibire una capacità di self-renewal in passaggi seriali in vivo. Ci sono però una serie di problemi tecnici relativi all'isolamento di cellule staminali tumorali da tumori epiteliali o altri tumori solidi, in parte dovuti alle difficoltà di disgregazione di questi tumori.

Tuttavia, negli ultimi anni molte pubblicazioni hanno suggerito l'esistenza di cellule staminali tumorali in molti tumori solidi.

Ad oggi sono disponibili tre differenti approcci per l'isolamento di cellule staminali tumorali.

- I tumori solidi sono stati spesso studiati utilizzando le tecniche sviluppate per lo studio dell'ematopoiesi normale e delle cellule staminali leucemiche, tra cui l'identificazione di marcatori di superficie. Marcatori utili per l'isolamento di cellule staminali ematopoietiche sono stati testati per lo studio di cellule staminali leucemiche. Solamente cellule della leucemia mieloide che hanno marcatori simili alle cellule ematopoietiche più immature crescevano una volta iniettate in topi immunodepressi e dando luogo a leucemie. Il primo tumore solido ad essere studiato utilizzando questo metodo è stato il tumore al seno. Campioni umani di tumore al seno sono stati analizzati per l'espressione di CD44 e CD24 e le cellule tumorali sono state separate in diverse popolazioni tramite citometria a flusso. Solamente le cellule con profilo CD44⁺/CD24^{low/-} sono state in grado di formare tumori una volta iniettate in topi [Al-Hajj, 2003]. Con lo stesso approccio un vasto numero di marcatori cellulari di superficie si è dimostrato utile per l'isolamento di una sottopopolazione arricchita in cellule staminali tumorali. CD133, anche conosciuto come Prominina 1, è stato identificato come marcatore di cellule staminali tumorali in diversi tipi di tumori al cervello [Singh, 2004; Baier, 2007; Yuan, 2004] e anche in carcinomi colonrettali [Ricci-Vitiani, 2007], pancreatici [Hermann, 2007] e prostatici [Collins, 2005].
- Come osservato nel 1994 [Morshead, 1994], cellule del sistema nervoso centrale, cresciute su superfici non aderenti e con opportuni fattori di crescita, danno origine a aggregati cellulari chiamati "neurosferi" aventi capacità di self-renewal e in grado di differenziare nei principali tipi cellulari che costituiscono il cervello. Le neurosfere, in cui è presente il compartimento staminale, possono essere ripetutamente dissociate a singole cellule e una piccola frazione di queste può generare nuove neurosfere. La capacità di generare ripetutamente nuove neurosfere è evidenza di self-renewal. Questo saggio di formazione delle sfere è stato

in seguito applicato all'isolamento di cellule staminali tumorali da diversi tumori solidi come il tumore al seno [Phillips, 2006; Farnie, 2007; Grimshaw, 2008], tumori al cervello [Galli, 2004; Beier, 2007; Zheng, 2007], carcinoma pancreatico [Shanmiao, 2007], carcinoma della testa e del collo [Harper, 2007], tumori colonrettali [Dalerba, 2007] e tumore alla prostata [Tokar, 2005].

- La “side population” (SP) è una particolare popolazione cellulare arricchita in cellule primitive e indifferenziate. Molti autori affermano che la SP può essere una fonte arricchita di cellule staminali e anche uno strumento alternativo particolarmente utile in situazioni in cui non sono noti i marcatori delle cellule staminali tumorali [Hadnagy, 2006]. L'isolamento della SP si basa su una tecnica descritta da Goodell e collaboratori nel 1996 [Goodell, 1996] i quali hanno osservato che il pattern della fluorescenza dell'Hoechst 33342, solitamente utilizzato per studiare la distribuzione del ciclo cellulare, mostrava una piccola popolazione non marcata che si posiziona nel quadrante in basso a sinistra del profilo al FACS e che esprimeva marcatori di staminalità. L'esclusione dell'Hoechst 33342 da parte delle cellule della SP è un processo attivo che coinvolge il trasportatore 1 di membrana ABC. Infatti trattando le cellule con verapamil, un inibitore di MDR1, l'esclusione dell'Hoechst 33342 da parte delle cellule della SP diminuiva. La SP è stata identificata in molti tessuti normali e anche in diverse linee cellulari tumorali, come la linea di glioma C6, la linea di tumore al seno MCF7, la linea di neuroblastoma B104 e la linea di carcinoma della cervice HeLa [Kondo, 2004].

LE CELLULE STAMINALI NELLE PATOLOGIE RENALI

Negli ultimi anni ci sono evidenze in letteratura sull'esistenza di diverse fonti di cellule staminali renali [Sangrinati, 2008] che potrebbero essere utilizzate nel campo della medicina rigenerativa per il trattamento di danni renali. Le patologie renali croniche potrebbero essere curate tramite terapie cellulari negli stadi precoci della malattia, quando la funzionalità residua e l'istologia sono ancora preservate. La più importante proprietà delle cellule staminali è che esse sono capaci di generare molti e, in alcuni casi, tutti i tipi cellulari di

uno specifico organo. Nel rene esistono almeno 26 tipi cellulari differenziati in modo terminale, suggerendo che la potenzialità di una cellula staminale di differenziare nei molteplici tipi cellulari renali è critica per rigenerare il rene danneggiato in seguito a sclerosi glomerulare o danno tubulo-interstiziale.

Inoltre la definizione di cellula staminale tumorale nel rene, basata sull'analisi delle differenze con le cellule staminali renali adulte, potrà permettere una più approfondita conoscenza della biologia del carcinoma renale, la definizione di nuove ipotesi patogenetiche e lo sviluppo di nuovi marcatori e terapie rivolte ad esso.

Cellule staminali normali e tumorali nel rene

Risultati ottenuti in modelli preclinici di danno renale acuto o cronico hanno dimostrato la possibilità di somministrare cellule staminali o progenitori autologhi adulti derivanti dal midollo osseo per il trattamento di patologie renali acute e croniche. Le cellule staminali del midollo osseo sembrano essere un potente candidato per il trattamento di patologie renali. Studi preliminari hanno riportato che le cellule staminali del midollo non frazionate possono differenziare in cellule endoteliali e mesangiali in un modello di glomerulosclerosi [Li, 2006] e possono formare un numero importante di nuove cellule epiteliali tubulari in seguito a danno renale [Ikarashi, 2005; Lin, 2003]. Queste cellule staminali del midollo osseo non frazionate causavano però fibrosi interstiziale in stadi più avanzati, probabilmente mediata da cellule differenziate nella linea ematopoietica, come ad esempio macrofagi. In questo modo si stanno sviluppando nuovi studi sulla possibilità di utilizzare una popolazione selezionata di cellule staminali del midollo osseo, come le cellule staminali mesenchimali (MSC) [Morigi, 2004; Togel, 2005].

Anche le cellule staminali embrionali ottenute dalla *inner cell mass* della blastocisti sono state prese in considerazione come possibile fonte allogenica per lo sviluppo di terapie cellulari per patologie renali. Sebbene questioni etiche limitino il possibile utilizzo di queste cellule nella pratica clinica, alcuni studi hanno esaminato il loro potenziale clinico per la terapia cellulare del danno renale in modelli animali di ingegneria tissutale del rene [Kim, 2005]. In ogni caso, l'infinita capacità delle cellule staminali di proliferare

può portare al rischio di una crescita incontrollata in seguito a trapianto e al rischio di sviluppo di teratomi in seguito a iniezione in topi immunodepressi. Molto recentemente, l'identificazione nel rene adulto di una popolazione di cellule staminali adulte residenti nel rene che può differenziare in molteplici tipi cellulari e in grado di riparare in modo funzionale il tessuto renale danneggiato, suggerisce che queste cellule potrebbero rappresentare un mezzo efficace per la terapia cellulare delle patologie renali. Cellule staminali renali adulte sono state isolate utilizzando differenti strategie di selezione già utilizzate per isolare cellule staminali da altri organi.

La prima strategia prende spunto dal fatto che le cellule staminali sono cellule quiescenti a ciclo cellulare lento. Oliver e colleghi [Oliver, 2004] hanno isolato cellule quiescenti, caratterizzate da un forte segnale di BrdU e che hanno caratteristiche di cellule staminali, dalla papilla renale di topi e ratti. Queste cellule esprimono marcatori epiteliali e mesenchimali, formano sfere in coltura, proliferano e se iniettate in seguito a danno renale ischemico migrano nel sito del danno ricostituendo il tessuto danneggiato. Utilizzando questo approccio tre diversi gruppi hanno isolato e caratterizzato cellule "della side population" nel rene [Iwatani, 2004; Hishikawa, 2005; Challen, 2006].

Bussolati e colleghi [Bussolati, 2005] hanno invece isolato e coltivato una popolazione di cellule da rene umano adulto utilizzando CD133 come marcatore di selezione. Queste cellule non esprimevano marcatori ematopoietici e esprimevano PAX-2, un marcatore embrionale renale, suggerendo la loro origine renale. Cloni di singole cellule CD133⁺ erano capaci di espansione e self-renewal e differenziavano in vitro in cellule epiteliali o endoteliali. Una volta impiantati in topi SCID, le cellule non differenziate formavano strutture tubulari esprimendo marcatori epiteliali renali. In seguito a iniezione intravenosa in topi SCID con tubulonecrosi indotta da glicerolo, queste cellule migravano nel rene danneggiato e si integravano nei tubuli.

Anche Sangrinati e colleghi hanno selezionato, utilizzando CD133 e CD24, una sottopopolazione di cellule epiteliali parietali del glomerulo con un elevato potenziale di self-renewal e che poteva differenziare in cellule tubulari renali e anche osteociti e adipociti. L'iniezione di queste cellule CD24⁺/CD133⁺ in

topi SCID con danno renale acuto provocava la rigenerazione di strutture tubulari in differenti porzioni del nefrone [Sangrinati, 2006]. Il meccanismo con cui avviene il reclutamento di questi progenitori renali potrebbe coinvolgere il recettore canonico di SDF-1, CXCR4, e anche il recettore alternativo CXCR7 [Mazzinghi, 2008].

Nell'ultimo anno due diversi gruppi hanno tentato di identificare una popolazione di cellule staminali iniziante il carcinoma renale.

Bussolati e colleghi hanno identificato una popolazione CD133⁺ anche nel carcinoma renale, ma queste cellule progenitrici non erano tumorigeniche in vivo ma piuttosto supportavano l'angiogenesi e la crescita tumorale in presenza di cellule tumorali [Bruno, 2006]. Successivamente lo stesso gruppo ha tentato di individuare una popolazione di cellule staminali mesenchimali nel carcinoma renale valutando se questa potesse esibire proprietà inizianti il tumore. Le cellule esprimenti un marcatore staminale mesenchimale CD105 sono state separate, clonate e caratterizzate. Cellule CD105⁺ avevano capacità clonogeniche, esprimevano tipici marcatori di staminalità, avevano capacità di crescere come sferoidi non aderenti, differenziavano in cellule epiteliali e endoteliali e generavano in vivo tumori serialmente trapiantabili [Bussolati, 2008].

Addla e colleghi hanno invece isolato e caratterizzato una *side population* da tessuto renale umano normale e tumorale [Addla, 2008]. Queste SP erano arricchite di marcatori staminali, dimostravano un grande potenziale proliferativo, un'elevata efficienza nel formare colonie e colture a lungo termine e capacità di formare sfere. La SP renale era arricchita in cellule quiescenti, con un alto potenziale proliferativo e proprietà staminali. Questa popolazione era tuttavia eterogenea confermando che i termini "cellule della SP" e "cellule staminali" non possono essere utilizzati in modo intercambiabile.

SCOPO DELLA RICERCA

Dati relativi alla presenza di cellule staminali adulte nel rene normale o tumorale sono ad oggi incompleti. Infatti, sebbene ci siano dati in letteratura che suggeriscono che la rigenerazione di cellule epiteliali tubulari sia il meccanismo di riparazione predominante in seguito a danno tubulare ischemico nel rene adulto di mammifero [Humphreys, 2008] e che questo meccanismo di riparazione accada indipendentemente da qualsiasi contributo da parte di cellule staminali [Duffield, 2005], l'esistenza di una cellula staminale renale adulta residente è ancora dibattuta. Diversi gruppi hanno spesso ottenuto risultati discordanti e l'identità di una cellula staminale renale non è ancora stata esaurientemente descritta [Alison, 2009]. Anche le informazioni circa una cellula staminale tumorale del carcinoma renale sono scarse e uno studio più approfondito delle cellule staminali renali normali e tumorali potrà risultare di reciproco aiuto per la loro caratterizzazione. Gli unici lavori presenti in letteratura che descrivono l'identificazione di progenitori nel rene umano adulto e nel carcinoma renale si basano sull'utilizzo di marcatori di superficie non sempre attendibili in quanto non sempre in grado di discriminare tra cellule staminali e progenitori. Inoltre non è chiaro se le cellule da loro identificate siano progenitori mesenchimali derivanti dal midollo osseo migrati ed insediati nel rene oppure cellule residenti renali. Risulta quindi necessario approfondire gli studi per valutare l'esistenza di una popolazione staminale renale utilizzando anche metodiche differenti rispetto a quelle già descritte in letteratura.

Da alcuni anni il nostro laboratorio si occupa della caratterizzazione di colture primarie derivanti da rene normale e carcinoma renale che possono rappresentare un buon modello per lo studio delle differenze presenti tra il fenotipo normale e tumorale. L'esperienza acquisita nell'allestimento e manipolazione di tali colture primarie ci ha portato a sviluppare una metodica per l'isolamento delle cellule staminali renali normali e tumorali mediante un approccio funzionale già noto in letteratura per l'isolamento di cellule staminali normali e tumorali di altri tessuti che consiste nel selezionare dalla

popolazione cellulare renale le cellule capaci di formare sfere in sospensione, da noi chiamate “nefosfere”. E’ stato dimostrato che queste nefrosfere contengono una popolazione eterogenea: alcune cellule quiescenti, che sono le staminali con la capacità di *self-renewal*, e cellule in attiva replicazione, che sono i progenitori già *committed* verso un preciso fenotipo. Tali nefrosfere sono state caratterizzate dal punto di vista immunofenotipico, tramite FACS e immunofluorescenza su vetrino dopo citospin e dal punto di vista molecolare, tramite Real-Time PCR.

Sono state inoltre valutate le potenzialità differenziative in vitro delle cellule staminali renali normali in senso epiteliale e neuronale e le capacità di formare strutture tridimensionali in substrati semisolidi.

L’identificazione, la separazione e la dimostrazione della presenza di una popolazione di cellule staminali all’interno delle nefrosfere (cellule PKH^{high}) rappresenta inoltre il punto di partenza per studi ulteriori che potranno permettere la definizione di un esatto fenotipo delle cellule staminali renali, normali e tumorali. Le differenze tra queste cellule staminali potranno favorire lo sviluppo di nuove ipotesi sulla patogenesi del carcinoma renale e la definizione di nuovi marcatori molecolari diagnostici e terapeutici.

RISULTATI

ALLESTIMENTO E COLTURA DI NEFROSFERE DA TESSUTO RENALE NORMALE E CARCINOMA RENALE

Non essendo disponibili marcatori attendibili per l'isolamento di cellule staminali renali adulte abbiamo utilizzato un approccio funzionale già ampiamente descritto in letteratura per altri tipi di tessuti sia normali che tumorali, quali cervello, tessuto mammario, prostata, pancreas e colon. Tale approccio permette di ottenere un arricchimento in vitro di cellule staminali e progenitori. Basandosi quindi sui protocolli di coltura per il mantenimento e per la propagazione delle cellule staminali umane adulte, si è cercato di stabilire un protocollo analogo a partire da campioni di tessuto renale.

La sospensione di singole cellule ottenute da tessuto renale sano e carcinoma renale è stata coltivata in condizioni non aderenti, in assenza di siero, a bassa densità e in presenza di EGF e bFGF. In queste condizioni si è osservato che la maggior parte delle cellule va incontro ad "anoikis", termine specifico che indica l'apoptosi di cellule non trasformate che avviene in assenza di ancoraggio ad un substrato. Poche cellule sono in grado di sopravvivere formando aggregati sferici denominati diversamente a seconda del tessuto di partenza (es: mammosfere dal tessuto mammario, neurosfere dal cervello) e composti da una o poche cellule staminali e da cellule progenitrici [Dontu, 2003; Morshead, 1994].

4-5 giorni dopo la piastratura delle cellule renali normali e tumorali nelle condizioni di coltura sopra descritte si inizia ad osservare in piastra la presenza di aggregati in sospensione che dopo 12 giorni formano "nefrosfere" propagabili poi in coltura fino a 10 passaggi se non bloccate prima per motivi sperimentali.

L'allestimento e la coltura di nefrosfere che raggiungono almeno la quarta generazione sono stati possibili per 13 dei 15 campioni di tessuto normale analizzato (2 campioni sono andati incontro a contaminazioni batteriche) quindi con un'efficienza pari al 86,7%. Per il tessuto tumorale l'efficienza

risulta minore, 60%; su un totale di 15 tumori, 9 sono stati in grado di produrre almeno sfere di quarta generazione, 2 hanno generato solamente le sfere primarie, 2 sono andati incontro a contaminazione batterica e 2 non sono stati in grado di generare sfere. Quindi poco più della metà dei tumori da noi analizzati è in grado di generare sfere contenenti cellule staminali con la capacità di self-renewal e quindi di rigenerare sfere nelle generazioni successive. Questo comportamento da parte del tessuto tumorale risulta comunque in linea con quanto descritto in letteratura [Ponti, 2005].

Conoscendo il numero di cellule piastrate per ogni pozzetto è stato possibile calcolare l'efficienza di formazione delle sfere (SFE) data dal numero di sfere ottenute diviso per il numero di cellule piastrate, il tutto espresso in percentuale [Farnie, 2007].

	SFE		n° cell/sfera
	Sfere primarie (%)	Sfere secondarie (%)	
Rene normale	0,74 ± 0,15	0,74 ± 0,13	144 ± 22
RCC	0,98 ± 0,51	0,89 ± 0,61	132 ± 33

Tabella 1: Efficienza di formazione delle sfere primarie e secondarie normali e tumorali (media ± SD) e numero di cellule per sfera nei diversi passaggi (media ± SD). I dati sono riferiti a 8 dei 15 casi analizzati.

Le cellule ottenute dal tessuto renale normale sono in grado di formare sfere con un'efficienza media di 0,74% sia nella prima che nella seconda generazione. L'efficienza di formazione delle sfere delle cellule ottenute da tessuto tumorale è lievemente superiore con una media di 0,98% nella prima e 0,89% nella seconda generazione. Il numero di cellule per sfera varia tra 130 e 180 per le sfere normali e tumorali sia nella prima che nella seconda generazione.

CLONALITÀ DELLE NEFROSFERE

Per verificare che una nefrosfera non è un semplice aggregato di cellule, ma che si origina in modo clonale da una singola cellula, è stato utilizzato un particolare colorante fluorescente, il PKH (Sigma-Aldrich), che viene

incorporato stabilmente nella membrana plasmatica delle cellule mediante una coda lipofilica legata ad un cromoforo. Questo tipo di colorante è stato usato in precedenza per studi di proliferazione *in vitro* e *in vivo* per marcare le cellule [Batard, 2000; Givan, 1999].

Dopo il processamento dei campioni di tessuto renale normale e tumorale come descritto nella relativa sezione dei materiali e metodi, la miscela di cellule singole viene colorata in parte con il colorante fluorescente rosso PKH26 e in parte con il colorante verde PKH2. Le due popolazioni rosse e verdi sono state coltivate per formare sfere separatamente oppure in un'unica sospensione. Dopo 12 giorni di coltura, le sfere mostravano all'interno cellule colorate. Nella coltura con la doppia colorazione non si osservavano sfere contenenti contemporaneamente cellule rosse e cellule verdi (Figura 5). Nelle singole nefrosfere i coloranti non si mischiano, dimostrando che una sola cellula ha dato origine alla sfera e che quindi le nefrosfere hanno origine clonale.

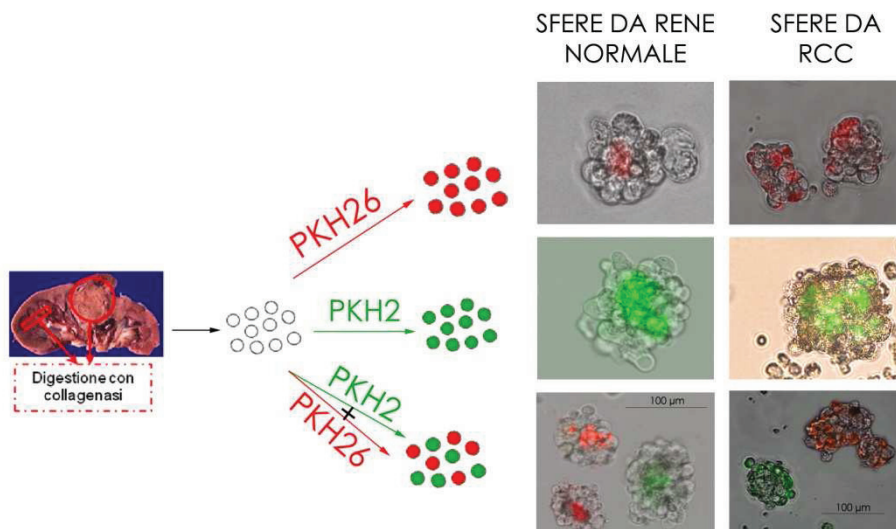


Figura 5: Valutazione dell'origine clonale delle nefrosfere

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELLE NEFROSFERE

Le nefrosfere contengono cellule con proprietà staminali

L'identificazione di cellule staminali all'interno delle nefrosfere è stata effettuata basandosi sulla loro caratteristica di essere quiescenti e di andare incontro a poche divisioni cellulari, a differenza dei progenitori in attiva replicazione. La tecnica utilizzata a tale scopo si basa sull'utilizzo del colorante fluorescente PKH26, già descritto in precedenza. E' stato dimostrato che l'intensità di questo colorante dimezza ad ogni divisione cellulare [Lansdorp, 1993; Cicalese, 2009]; sulla base di questa osservazione è stato quindi possibile approntare un modello sperimentale che permette di dimostrare la presenza di cellule staminali, quiescenti all'interno della popolazione cellulare in studio.

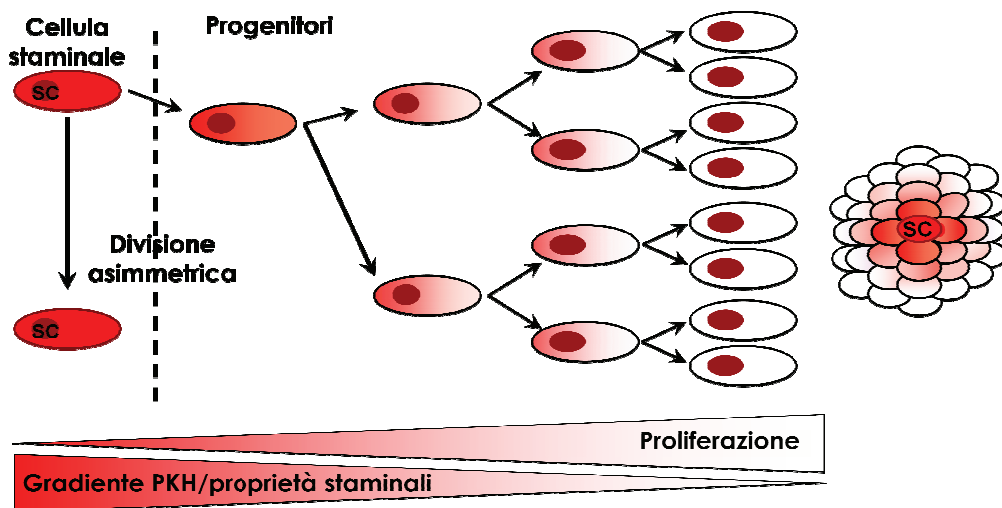


Figura 6: Razionale all'uso del colorante PKH26 per dimostrare la presenza di cellule quiescenti nella popolazione cellulare in studio

Nella figura 6 è schematizzato come il colorante PKH26 venga ritenuto in cellule quiescenti e diluito in cellule in attiva proliferazione. Utilizzando questa tecnica possiamo quindi osservare mediante analisi con microscopio a fluorescenza all'interno delle nefrosfere ottenute da tessuto sia normale che

tumorale la presenza di cellule più intensamente fluorescenti, le staminali e di cellule meno fluorescenti, i progenitori già differenziati (Figura 7).

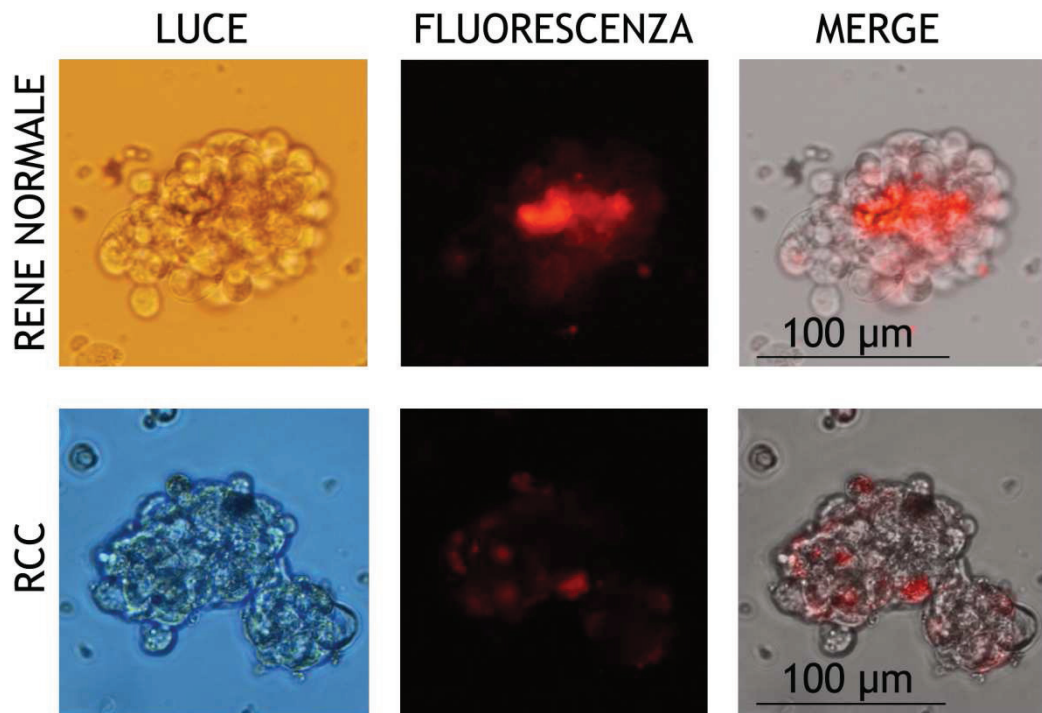


Figura 7: Analisi in contrasto di fase e fluorescenza di nefrosfere renali normali e tumorali colorate con PKH26

Valutazione dell'espressione di marcatori renali nelle nefrosfere

Negli scorsi anni il nostro laboratorio si è occupato dell'allestimento e della caratterizzazione citologica e molecolare di colture primarie renali derivanti da tessuto normale e tumorale [Bianchi, 2009]. Sono stati quindi identificati i marcatori cellulari che caratterizzano il fenotipo del tessuto di origine. Citocheratina, E-Caderina e Vimentina sono marcatori delle cellule epiteliali renali, normali e tumorali, in coltura. L'espressione della Vimentina nelle cellule renali normali è una caratteristica delle cellule tubulari coltivate in vitro, non si osserva infatti un'espressione di tale marcatore nelle cellule tubulari nel tessuto corticale e midollare [Forino, 2006]. Citocheratina e Vimentina risultano quindi coesprese nelle cellule epiteliali renali in coltura.

Sono entrambi marcatori citoscheletrici come evidenziato nelle immagini ottenute con microscopio a fluorescenza (Figura 12). Per l'identificazione delle cellule di origine prossimale è stato utilizzato l'anticorpo anti-CD13 [Baer, 1997], che riconosce una proteina transmembrana specifica dell'orletto a spazzola, e colora uniformemente la superficie dell'intera cellula (Figura 8). Per l'identificazione delle cellule di origine distale è stato utilizzato l'anticorpo anti-Calbindina D [Hemmingsen, 2000], una proteina legante il calcio con localizzazione citoplasmatica (Figura 8). Per valutare la contaminazione nelle colture primarie da parte di fibroblasti abbiamo analizzato l'espressione dell' α -SMA (α - smooth muscle actin), un marcatore citoscheletrico mesenchimale che nel rene umano è espresso dai fibroblasti attivati e da cellule tubulari che sono andate incontro a transizione epiteliale mesenchimale (Figura 8) [Strutz, 2006; Thedieck, 2007].

Le sfere ottenute da tessuto renale normale esprimono gli stessi marcatori delle rispettive colture primarie coltivate in condizioni differenziative (Figura 8). Con l'immunofluorescenza dopo citospin possiamo affermare che le sfere contengono cellule che esprimono marcatori di differenziamento renale, ma non possiamo valutare se tutte le cellule all'interno delle sfere esprimono i marcatori. Citocheratina e Vimentina sono entrambe espresse, dimostrando la derivazione epiteliale delle nefrosfere. Mentre nelle nostre colture primarie le cellule che esprimono CD13 non sono positive per la Calbindina D [Bianchi C, 2009], le sfere sembrano contenere cellule che esprimono marcatori tubulari sia prossimali che distali. Rispetto alle colture primarie, l'espressione dell' α -SMA sembra essere maggiore nelle cellule che compongono le sfere che potrebbero non essere fibroblasti ma cellule che sono andate incontro a transizione epiteliale-mesenchimale e che acquisiscono quindi tratti di staminalità (Figura 8).

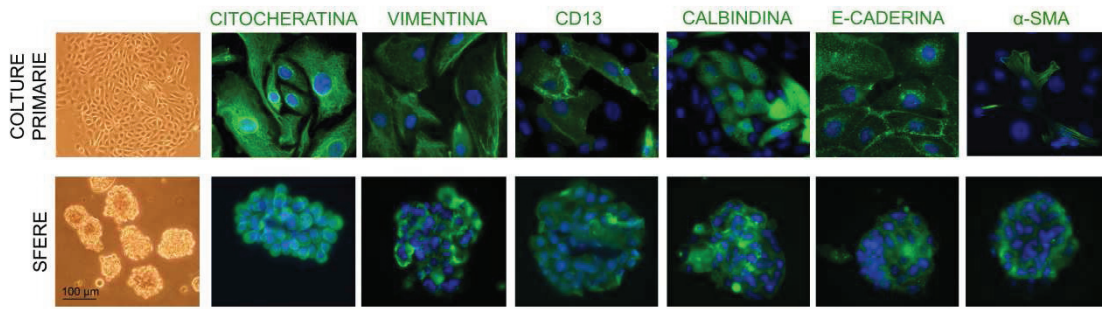


Figura 8: Espressione di marcatori renali nelle colture primarie e nelle nefrosfere ottenute da tessuto renale normale. **Le immagini a sinistra sono in contrasto di fase (Ingrandimento 100X), tutte le altre sono state ottenute con un microscopio a fluorescenza (Ingrandimento 400X)**

L'espressione della Citocheratina nelle colture primarie e nelle sfere è stata valutata anche tramite FACS e, nel caso delle sfere, valutata con immunofluorescenza dopo citospin osservando i vetrini ad un microscopio confocale. Solamente il 53% delle cellule che compongono le sfere risultano positive per Citocheratina contro il 95% delle cellule delle colture primarie (Figura 9a). Inoltre al microscopio confocale (Figura 9b) osserviamo che solamente le cellule più esterne alla sfera esprimono Citocheratina e che non c'è una sovrapposizione tra il segnale del PKH26 (in rosso) al centro della sfera e il segnale della Citocheratina (in verde) all'esterno della sfera. Questo risultato suggerisce che le cellule PKH negative all'esterno della sfera sono già indirizzate verso una linea epiteliale mentre quelle più fluorescenti per il PKH rappresentano le staminali quiescenti all'interno della sfera.

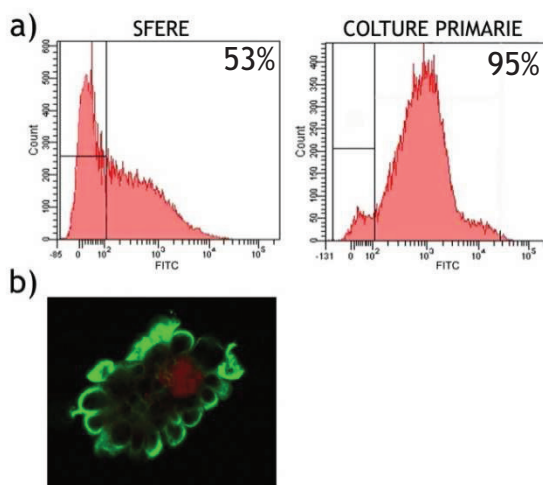


Figura 9: Espressione di Citocheratina: a) nelle sfere e nelle colture primarie analizzate mediante FACS; b) in una nefrosfera analizzata al microscopio confocale dopo citospin (in verde la Citocheratina e in rosso il PKH26)

Anche le cellule che compongono le nefrosfere ottenute da tessuto tumorale esprimono Citocheratina, Vimentina e E-Caderina, confermando una derivazione di tipo epiteliale e, come osservato per le nefrosfere normali, l' α -SMA sembra essere maggiormente espressa nelle cellule che compongono le sfere rispetto alle colture primarie (Figura 10)

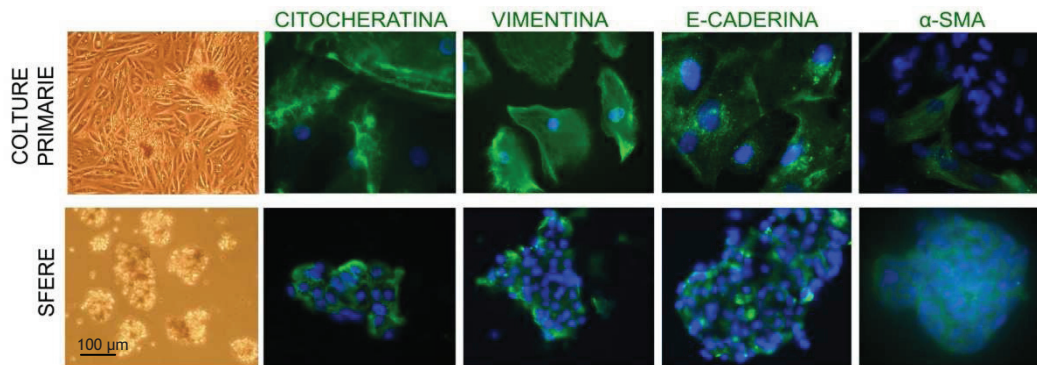


Figura 10: Espressione di marcatori renali nelle colture primarie e nelle nefrosfere ottenute da tessuto renale tumorale. Le immagini a sinistra sono in contrasto di fase (Ingrandimento 100X), tutte le altre sono state ottenute con un microscopio a fluorescenza (Ingrandimento 400X)

Valutazione dell'espressione di marcatori di staminalità nelle nefrosfere

Lo stesso confronto tra nefrosfere e colture primarie è stato effettuato valutando in FACS alcuni marcatori descritti in letteratura come marcatori di staminalità per individuare un marcatore specifico per la cellula staminale renale.

Sono stati studiati i seguenti marcatori:

- CD44: è una glicoproteina di membrana espressa su tutti i leucociti, le cellule endoteliali e le cellule mesenchimali. E' una molecola di adesione coinvolta nell'*homing* e nell'aggregazione dei leucociti. Negli ultimi anni è stato identificato come marcatore di cellule staminali tumorali del tumore al seno, al colon, al pancreas e alla prostata.
- CD24: è una proteina legata al glicosilfosfatidilinositolo nota anche come antigene stabile al calore (HSA). E' comunemente espressa sulla superficie

delle cellule B e dei granulociti. Potrebbe avere un ruolo nella proliferazione e maturazione delle cellule B. Recentemente è stata descritta come marcatore di cellule staminali tumorali del tumore al seno e di progenitori renali.

- CD133: nota anche come Prominina 1, è stata identificata come marcatore di progenitori nel fegato fetale, nel midollo osseo, nel sangue del cordone ombelicale e nel sangue periferico e recentemente è risultata espressa nei progenitori endoteliali circolanti, nelle cellule staminali neuronali, renali, prostatiche e corneali.
- CD29: glicoproteina anche conosciuta come integrina $\beta 1$. E' largamente espressa su un grande numero di cellule ematopoietiche e non. CD29 è un membro della famiglia delle integrine; è associata non covalentemente con le catene dell'integrina $\alpha 1$ - $\alpha 6$ per formare le molecole VLA-1 o VLA-6. Agisce come recettore della fibronectina. Recentemente è stata descritta come marcatore di cellule staminali tumorali in diversi tumori.

CD44, CD24 e CD29 risultano più espressi nelle colture primarie normali rispetto alle cellule che compongono le sfere normali. Il CD133 non mostra differenze significative tra i due gruppi (Figura 11).

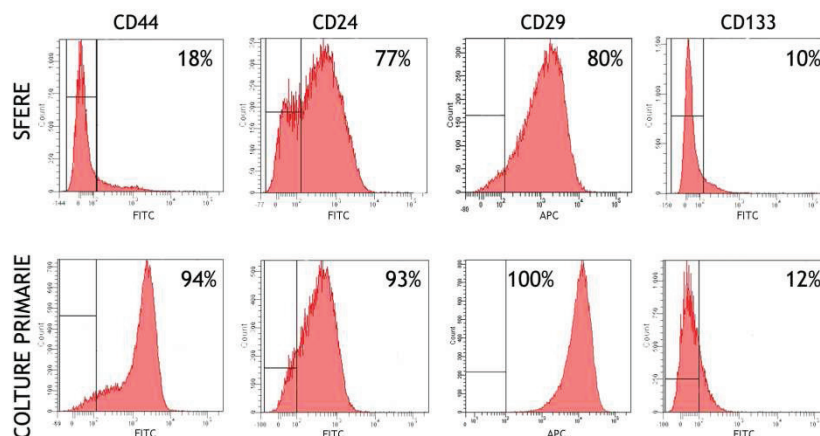


Figura 11: Espressione di marcatori staminali valutata mediante FACS nelle colture primarie e nelle nefrosfere ottenute da tessuto renale normale

CD44, CD24 e CD29 risultano più espressi anche nelle colture primarie tumorali rispetto alle cellule che compongono le sfere tumorali. Il CD133 non mostra differenze significative tra i due gruppi (Figura 12).

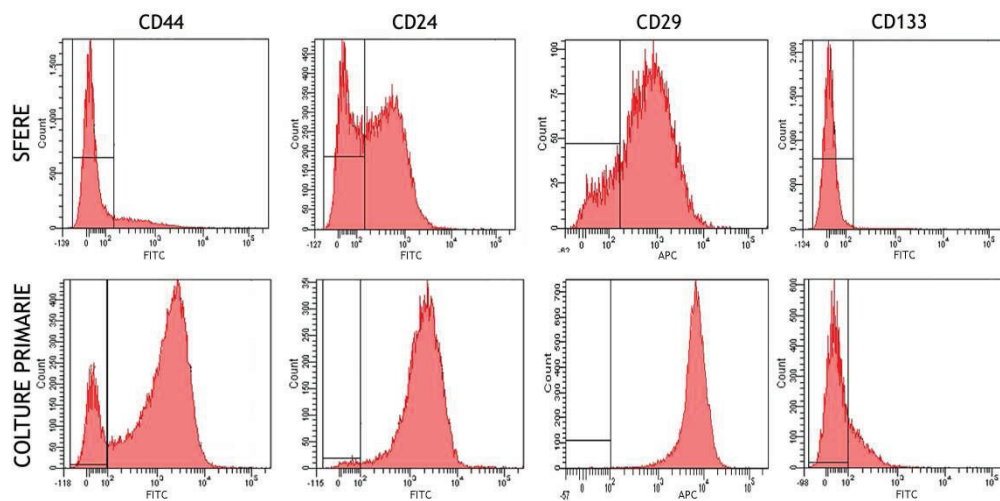


Figura 12: Espressione di marcatori staminali valutata mediante FACS nelle colture primarie e nelle nefrosfere ottenute da tessuto renale tumorale

Nonostante queste proteine siano descritte in letteratura come marcatori di cellule staminali in molti tessuti, non sembrano essere adatti a questo scopo nel nostro caso in quanto risultano espressi anche dalle cellule delle colture primarie già differenziate in vitro.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLE NEFROSFERE

Per dimostrare ulteriormente la presenza di cellule con proprietà e fenotipo staminale all'interno delle nefrosfere derivanti da tessuto renale normale e tumorale, è stata valutata mediante TaqMan Low Density Array (Applied Biosystems), in particolare Human Stem Cell Pluripotency Panel, l'espressione di 96 geni specifici per la valutazione del pattern di staminalità. Questi array contengono 96 geni, spottati in quadruplicato, suddivisi in 5 classi: 7 geni tipicamente espressi nelle cellule indifferenziate o correlati con il mantenimento della pluripotenza, 34 geni correlati con la staminalità, 50 marcatori di differenziamento e 5 geni housekeeping.

L'analisi dei trascritti di questi 96 geni (elencati nella tabella 1 dei materiali e metodi) è stata condotta sugli RNA estratti dalle nefrosfere normali e tumorali e dalle rispettive colture primarie normali e tumorali di tre pazienti.

Molti dei geni descritti, in particolare quelli che appartengono alla categoria dei marcatori di differenziamento, non sono specifici per il rene, infatti 42 di questi non risultano espressi in nessuno dei campioni da noi considerati. La mancata espressione nei nostri campioni di geni espressi tipicamente in tessuti non renali conferma la purezza del nostro modello cellulare e dà indicazioni sui possibili lineage differenziativi presenti nella popolazione cellulare delle sfere. L'analisi statistica è stata condotta quindi sui restanti 54 geni che comprendono 5 geni tipicamente espressi nelle cellule indifferenziate o coinvolti nel mantenimento della pluripotenza, 23 geni correlati con la staminalità, 21 marcatori di differenziamento e 5 geni housekeeping. L'analisi statistica ha mostrato che l'espressione di 36 di questi 54 geni risultava significativamente differente tra i diversi campioni.

Utilizzando il software gratuito e scaricabile on line TMEV 4.4 è possibile ottenere una “mappa di calore” che rappresenta l'espressione dei geni di interesse. I valori dei ΔCt dei 36 geni differenzialmente espressi tra sfere e colture normali e tumorali sono stati inseriti nel software TMEV 4.4; si ottiene così un diagramma che associa un particolare valore di ΔCt a una gradazione di colore che varia dal rosso al verde. Al verde corrispondono valori più bassi di ΔCt e quindi una maggiore espressione del gene di interesse, al rosso corrispondono valori più alti di ΔCt e quindi una minore espressione del gene di interesse. Con il software TMEV è anche possibile raggruppare i dati inseriti per somiglianza di campione; inserendo i 36 geni osserviamo che il software raggruppa i campioni in base al fenotipo normale o tumorale e non al fatto che siano colture primarie differenziate o sfere (Figura 13).

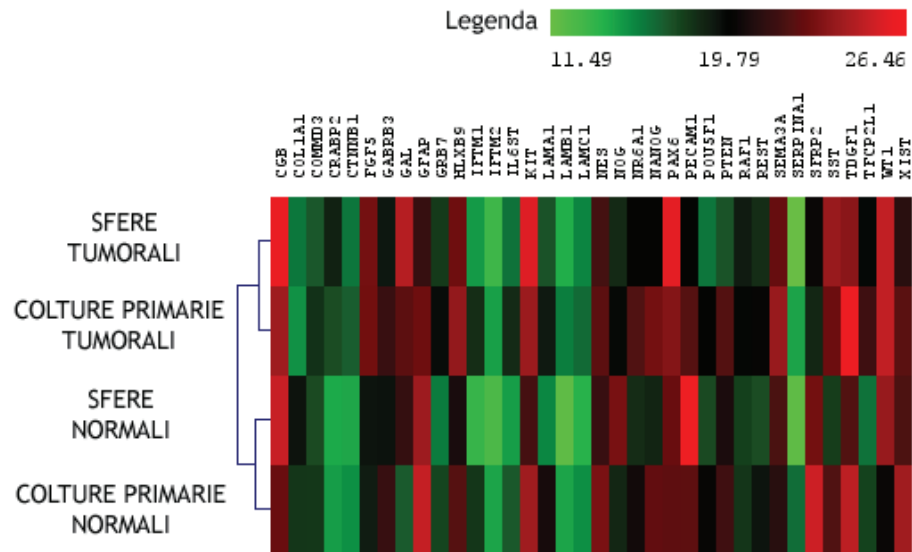


Figura 13: Rappresentazione colorimetrica dell'espressione dei 36 geni risultati statisticamente significativi nei campioni analizzati: in rosso i geni meno espressi e in verde i geni più espressi.

Dei 36 geni differenzialmente espressi osserviamo che: 10 geni sono diversamente espressi tra colture normali e colture tumorali, 22 geni sono diversamente espressi tra sfere normali e sfere tumorali e 30 geni sono diversamente espressi tra sfere e colture.

Nella tabella 2 sono elencati i 10 geni diversamente espressi tra colture normali e colture tumorali, di cui 2 overespressi nelle colture tumorali e 8 nelle colture normali.

	COLTURE PRIMARIE RCC>NK	COLTURE PRIMARIE NK>RCC
COL1A1	p=0,0083	
CRABP2		p=0,0001
FGF5		p=0,0017
GAL		p<0,0001
GRB7		p<0,0001
RAF1		p=0,0206
SEMA3A		p=0,0076
SFRP2	p=0,0021	
TFCP2L1		p=0,0001
WT1		p=0,0134

Tabella 2: Elenco dei geni s differenzialmente espressi tra le colture renali normali (NK) e tumorali (RCC) con i valori di significatività statistica.

Nella tabella 3 sono invece elencati i 22 geni differenzialmente espressi tra sfere normali e tumorali, di cui 6 overespressi nelle sfere tumorali e 16 nelle sfere normali.

	SFERE RCC>NK	SFERE NK>RCC
COL1A1	p=0,0006	
COMM3	p=0,005	
CRABP2		p=0,05
CTNNA1		p=0,0096
FGF5		p=0,004
GFAP	p=0,0006	
GRB7		p<0,0001
HLXB9		p=0,0211
IFITM1		p=0,0224
IL6ST		p=0,0011
KIT		p=0,0077
LAMA1		p=0,0339
LAMB1		P=0,0007
LAMC1		p=0,0009
NOG	p=0,0012	
NR6A1		p=0,0012
POU5F1	p=0,0362	
PTEN	p=0,0032	
RAF1		p=0,0017
SST		p=0,0007
TDGF1		p=0,0141
TCFP2L1		p=0,0226

Tabella 3: Elenco dei geni differenzialmente espressi tra sfere normali (NK) e sfere tumorali (RCC) con i valori di significatività statistica.

Nella tabella 4 sono elencati infine i 30 geni differenzialmente espressi tra sfere e colture con i relativi valori di significatività. L'analisi statistica ha mostrato che 23 geni sono overespressi nelle sfere, normali o tumorali, rispetto alle colture primarie corrispondenti.

	GENI OVERESPRESSI NELLE SFERE		GENI OVERESPRESSI NELLE COLTURE	
	NK	RCC	NK	RCC
CGB			p=0,0019	NS
COL1A1			P=0,0375	NS
COMMD3	p=0,0248	p=0,0032		
CTNNB1	p=0,0245	NS		
GABRB3	p=0,022	p=0,0001		
GAL			p<0,0001	NS
GRB7	p=0,0002	p<0,0001		
HLXB9	p=0,048	NS		
IFITM1	p=0,0001	p=0,0305		
IFITM2	p<0,0001	NS		
IL6ST	p=0,0167	NS		
LAMA1	p<0,0001	NS		
LAMB1	p=0,0008	NS		
LAMC1	p=0,0021	NS		
NES	p=0,0033	NS		
NOG			p<0,0001	NS
NR6A1	p<0,0001	p=0,0032		
NANOG	p=0,0356	p=0,05		
PAX6			NS	p=0,0334
PECAM1			p=0,0017	NS
POU5F1	p=0,0036	P=0,052		
PTEN	NS	p=0,0012		
REST	p=0,0458	NS		
SERPINA1	p<0,0001	p=0,0499		
SFRP2	p=0,0005	NS		
SST	p=0,0118	NS		
TDGF1	p=0,003	NS		
TFCP2L1	p=0,0356	NS		
XIST	p<0,0001	p<0,0001		
WT1			p=0,0008	NS

Tabella 4: Elenco dei geni statisticamente overespressi nelle sfere, normali (NK) o tumorali (RCC), rispetto le colture primarie corrispondenti (a sinistra) e dei geni statisticamente overespressi nelle colture primarie normali (NK) e tumorali (RCC) rispetto alle sfere corrispondenti (a destra) con i valori di significatività statistica. NS: non significativo.

Analizzando questi 23 geni tramite il software TMEV 4.4 osserviamo che i campioni vengono raggruppati per l'appartenenza a sfere o colture primarie (Figura 14).

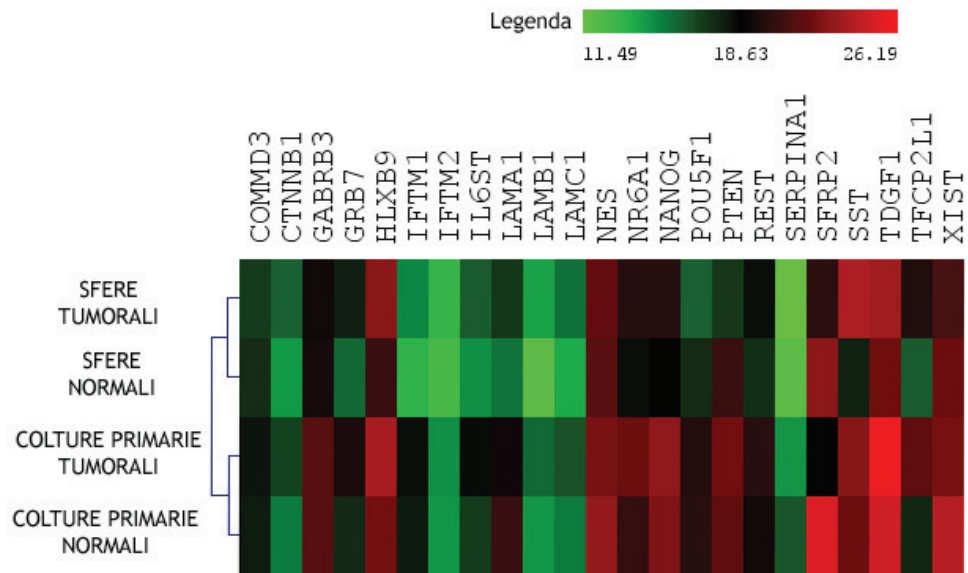


Figura 14: Rappresentazione colorimetrica dell'espressione dei 23 geni trovati overespressi significativamente nelle sfere rispetto alle colture primarie.

Questo tipo di analisi ci permette quindi di individuare quali sono i geni che rendono le sfere differenti dalle colture primarie. Se andiamo ad analizzare questi 23 geni individandone la classe di appartenenza, osserviamo che 4 geni sono tipicamente espressi in cellule indifferenziate o coinvolti con il mantenimento della pluripotenza, 12 geni sono correlati con la staminalità e 7 sono marcatori di differenziamento. Quindi 16 dei 23 geni che risultano statisticamente overespressi nelle nostre nefrosfere sono normalmente espressi nelle cellule staminali.

PROVE DI DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE DERIVANTI DALLE NEFROSFERE NORMALI

Differenziamento epiteliale

Per testare in vitro la capacità delle cellule che compongono le nefrosfere normali di differenziare nelle cellule epiteliali che costituiscono il tessuto renale, le cellule ottenute mediante la disgregazione delle sfere secondarie sono state coltivate in adesione con terreno DMEM con 100 mg/dl di glucosio e in presenza di siero, condizioni che favoriscono il differenziamento verso un fenotipo epiteliale. Già dopo 2 giorni le cellule mostravano la capacità di aderire alla piastra e crescevano come “olocloni” (Figura 15a)) per poi raggiungere la confluenza assumendo il tipico aspetto poligonale omogeneo (Figura 15b)), molto simile a quello delle colture primarie derivanti direttamente da tessuto renale normale (Figura 8).

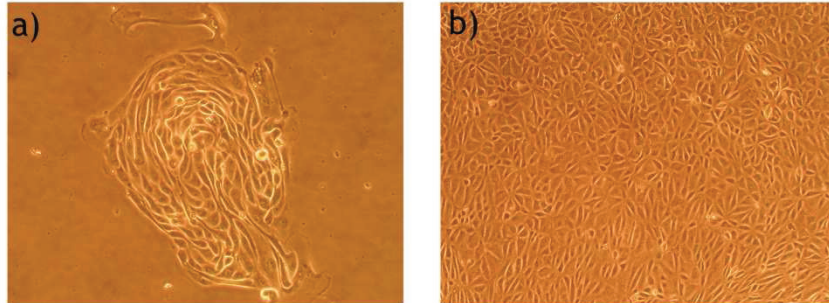


Figura 15: Immagini in contrasto di fase delle cellule derivanti da nefrosfere normali coltivate in condizioni che favoriscono il differenziamento epiteliale. a) “Oloclone” iniziale; b) Coltura a confluenza. Ingrandimento 100X

In seguito abbiamo valutato l’espressione dei marcatori comunemente espressi dalle cellule epiteliali renali in coltura, Citocheratina e Vimentina, e di un marcatore del tubulo prossimale, CD13, tramite FACS.

Non si osservano differenze nell’espressione di questi marcatori tra le cellule delle colture derivanti dalle nefrosfere e le cellule che compongono le colture

primarie ottenute direttamente dal tessuto (Figura 16). Come descritto in un nostro recente lavoro [Bianchi, 2009], circa il 94% delle cellule che compongono le colture primarie risultano positive per Citocheratina, circa l'88% per Vimentina e l'espressione del CD13 varia tra il 37% e il 67%. Tali percentuali sono mantenute nella popolazione cellulare delle nefrosfere in cui è stato indotto il differenziamento epiteliale. Possiamo così affermare che le cellule che compongono le sfere sono in grado di differenziare in cellule con fenotipo epiteliale tubulare.

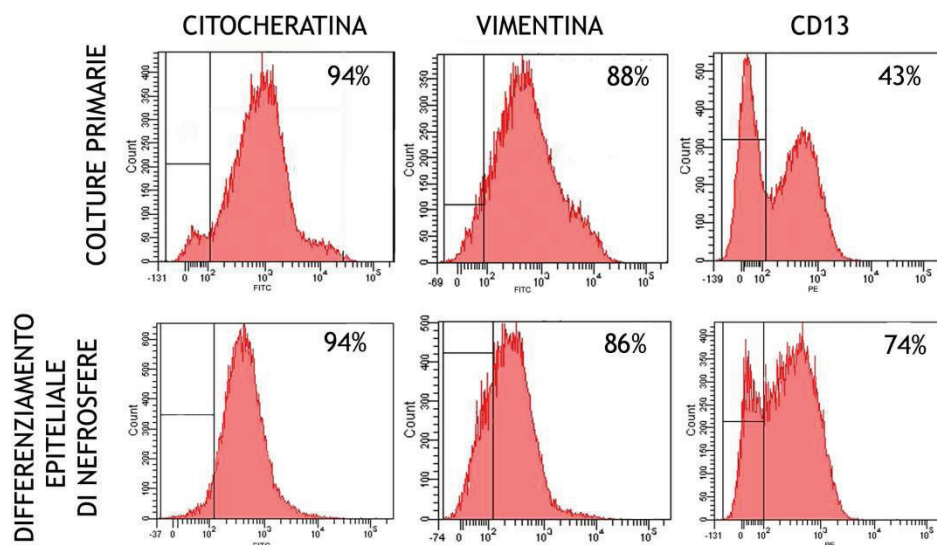


Figura 16: Analisi immunofenotipica tramite FACS della composizione cellulare delle colture derivanti direttamente da tessuto renale normale (in alto) e dalle nefrosfere normali differenziate verso un fenotipo epiteliale (in basso).

Generazione in vitro di strutture tridimensionali

Per valutare la capacità di generare strutture tridimensionali, le cellule derivate dalla disgregazione delle nefrosfere normali sono state risospese in una soluzione composta da Collagene di tipo I o Matrigel utilizzati per formare un substrato gelatinoso. Dopo 7 giorni possiamo osservare all'interno dei pozzetti lo sviluppo di strutture tridimensionali simili a tubuli e glomeruli (Figura 17).

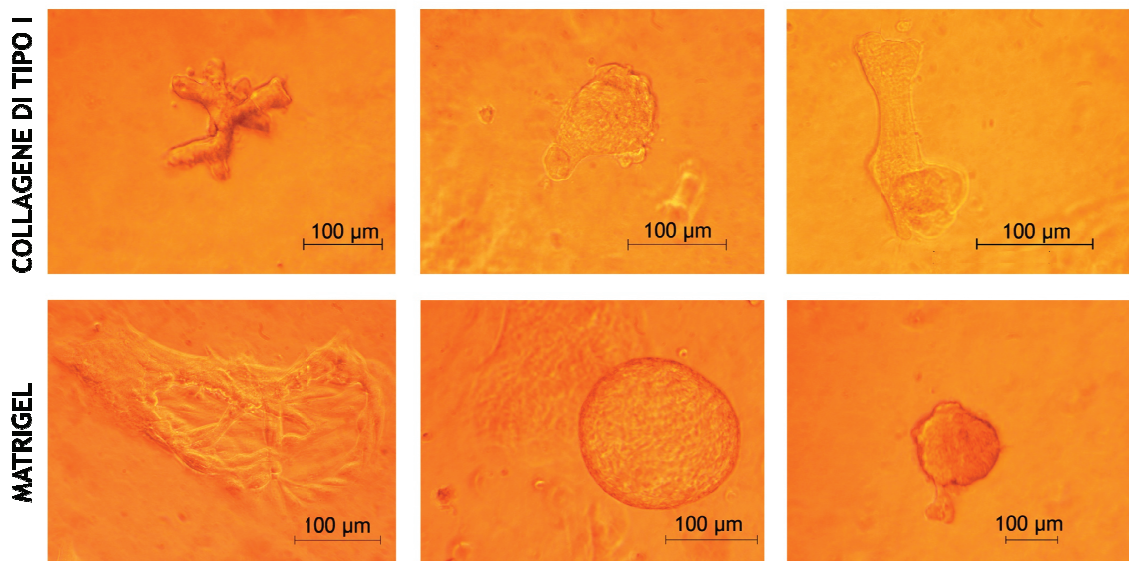


Figura 17: Formazione di strutture tridimensionali di aspetto tubulare e glomerulare in substrati semisolidi come Collagene di tipo I (sopra) e Matrigel (sotto). Immagini al microscopio in contrasto di fase.

Questi esperimenti hanno mostrato la capacità delle cellule che compongono le nefrosfere normali di differenziare in un fenotipo epiteliale e anche di formare strutture tridimensionali, simili a tubuli e glomeruli, in matrici semisolide. Per caratterizzare al meglio queste strutture tridimensionali, i blocchi di gel contenenti le strutture verranno fissati in formalina ed inclusi in paraffina per effettuare analisi in immunohistochimica.

Differenziamento neuronale

E' noto che le cellule staminali adulte tessuto-specifiche possono acquisire caratteristiche tipiche di cellule differenti dal tessuto di origine; questa proprietà è chiamata plasticità. Partendo da questo presupposto e dall'osservazione che tra i geni più espressi nelle sfere normali era presente Nestin, un marcatore di differenziamento neuronale, abbiamo coltivato le cellule derivanti dalle nefrosfere normali in condizioni che, come descritto in letteratura [Sangrinati, 2006], promuovono il differenziamento verso un fenotipo neuronale. Dopo circa 5 giorni di trattamento si osserva in piastra un rallentamento della crescita cellulare, rispetto alle cellule differenziate verso

il fenotipo epiteliale, e le cellule iniziano ad esibire prolungamenti, simili a neuriti, che terminano con peduncoli, indicati con una freccia (Figura 18).

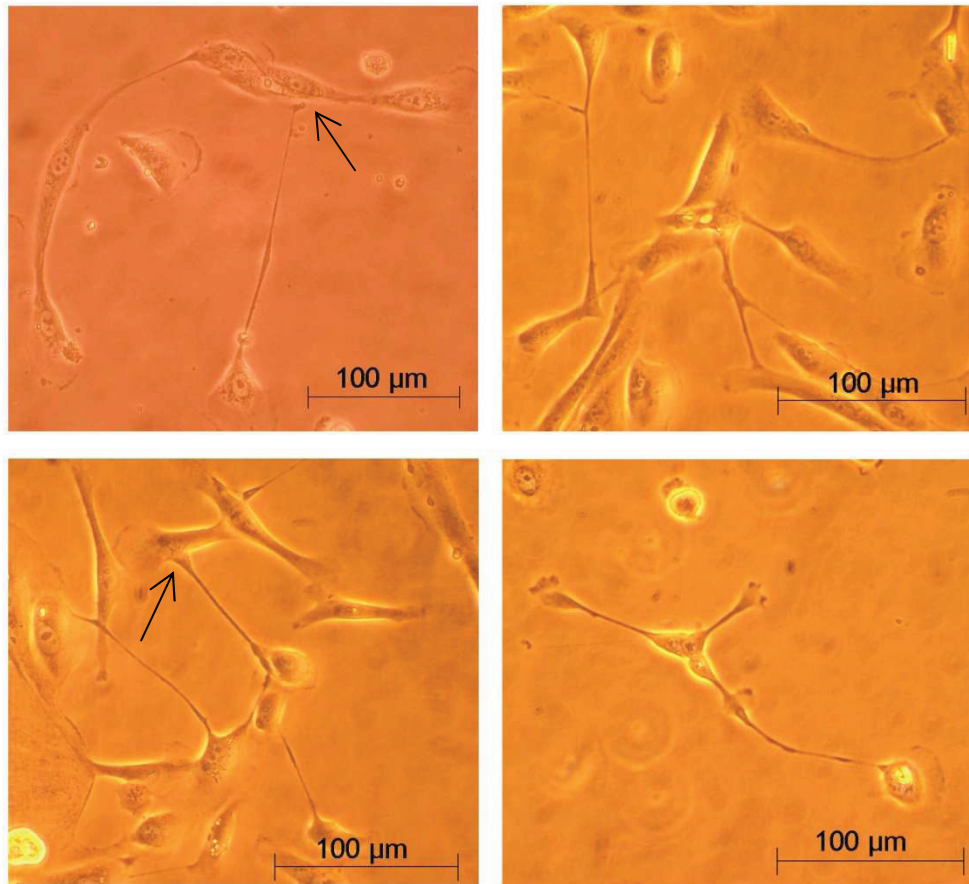


Figura 18: Immagini in contrasto di fase delle cellule derivanti da nefrosfere normali coltivate in condizioni che favoriscono il differenziamento neuronale. La freccia indica il peduncolo terminale delle strutture simili a neuriti.

Abbiamo poi valutato tramite immunofluorescenza su vetrino l'espressione di Citocheratina e dei marcatori di differenziamento neuronale MAP2 e NF200. Abbiamo inoltre marcato le cellule con tubulina e falloidina per meglio valutare la morfologia cellulare. Gli stessi marcatori sono stati anche valutati per confronto sulle cellule delle nefrosfere differenziate verso il fenotipo epiteliale (Figura 19).

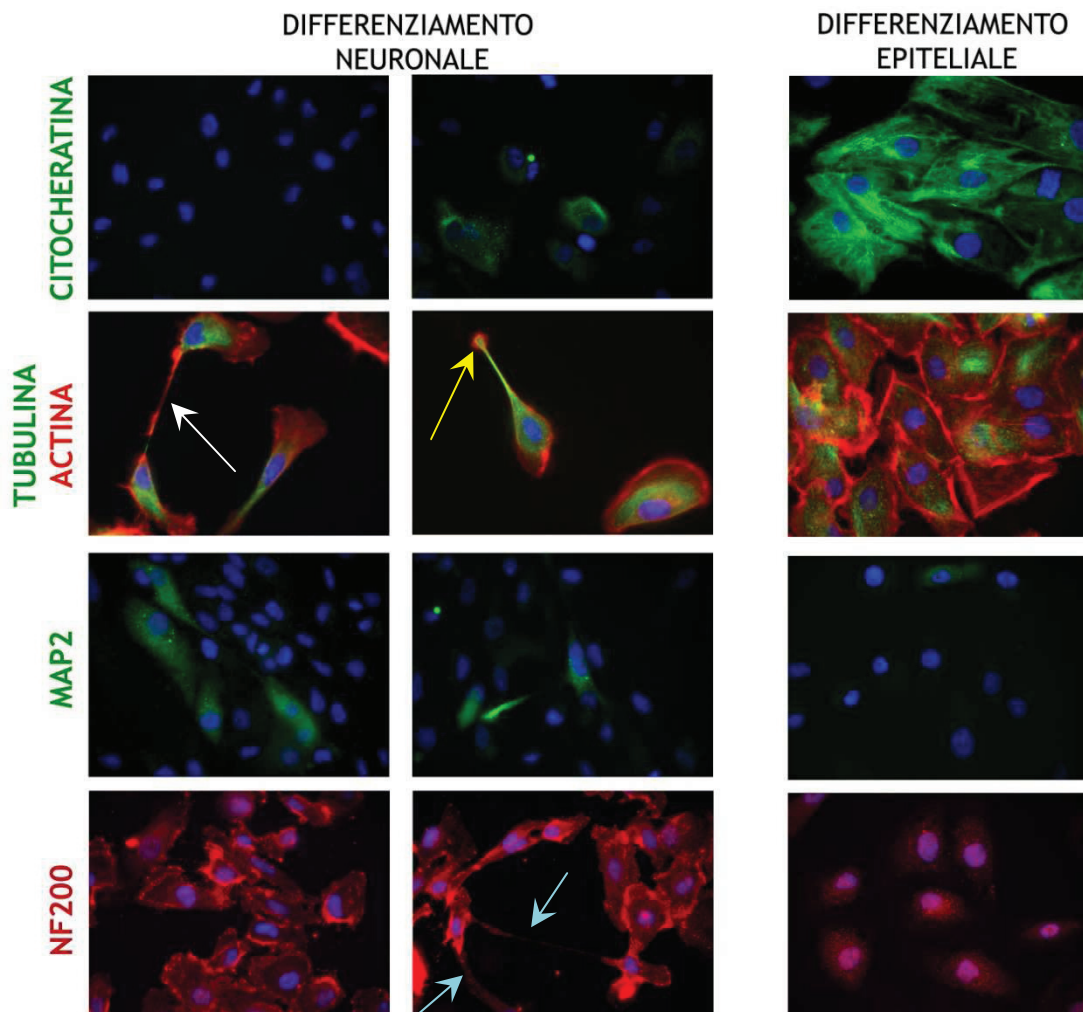


Figura 19: Valutazione tramite immunofluorescenza su vetrino dell'espressione del marcatore epiteliale e di marcatori neuronali su cellule derivate dalle nefrosfere e differenziate verso un fenotipo neuronale (a sinistra) e epiteliale (a destra). Ingrandimento 400X.

La Citocheratina, marcatore epiteliale, è molto espressa nelle cellule differenziate verso il fenotipo epiteliale con il tipico segnale citoscheletrico che ne evidenzia i filamenti intermedi. Osserviamo invece che nelle cellule differenziate verso un fenotipo neuronale il segnale della Citocheratina è assente oppure, se presente, non mostra un segnale specifico citoscheletrico ma una marcatura di tipo aspecifico debole e diffusa nel citoplasma (Figura 19).

La doppia marcatura con tubulina e falloidina, che si lega ai filamenti di F-actina, ci permette di valutare la differente morfologia tra i due tipi cellulari in analisi in modo molto preciso. Le cellule differenziate in senso neuronale

risultano più piccole rispetto alle epiteliali e sono ben visibili i prolungamenti, indicati dalla freccia bianca, attraverso cui le cellule sembrano interagire tra loro. La F-actina corticale nelle cellule epiteliali permette di evidenziarne la forma poligonale; nelle cellule differenziate verso il fenotipo neuronale la F-actina e la tubulina sono entrambe espresse lungo i filamenti e nel peduncolo l'actina circonda i filamenti di tubulina come indicato dalla freccia gialla (Figura 19).

Abbiamo poi valutato l'espressione di due marcatori neuronali, MAP2, la proteina associata ai microtubuli che ne regola l'estensione nei neuriti interagendo anche con i neurofilamenti e con l'actina citoscheletrica, e NF200, la subunità ad alto peso molecolare che costituisce i neurofilamenti, che nei neuroni rappresentano la maggior componente del citoscheletro svolgendo una funzione di supporto meccanico intervenendo nella regolazione del diametro assonale. MAP2 è espressa in modo specifico solamente in alcune cellule differenziate in senso neuronale mentre risulta praticamente assente nelle cellule epiteliali. NF200 mostra un segnale molto intenso, corticale e di membrana in tutte le cellule differenziate verso il fenotipo neuronale evidenziandone bene i prolungamenti, indicati dalla freccia azzurra (Figura 19). Le cellule epiteliali mostrano un segnale aspecifico di NF200 molto debole, concentrato nel nucleo e poco diffuso nel citoplasma.

Questi esperimenti preliminari di differenziamento verso un fenotipo neuronale hanno mostrato una certa plasticità delle nostre cellule staminali adulte nel differenziare in fenotipi non renali. Gli studi di differenziamento proseguiranno per trattamento delle cellule delle nefrosfere con ulteriori fattori di crescita neuronali per indurre maggiormente il differenziamento, che verrà valutato fenotipicamente con altri marcatori neuronali e funzionalmente con test di *Patch Clamp* per valutare l'eventuale conduzione elettrica delle cellule differenziate.

ISOLAMENTO DELLE CELLULE STAMINALI RENALI ADULTE NORMALI

In base agli esperimenti condotti fino a questo punto possiamo affermare che una nefrosfera è formata da una cellula staminale renale che, andando incontro ad una divisione asimmetrica, dà origine un'altra cellula staminale identica alla cellula madre, che rimane quiescente, e ad un progenitore renale in attiva replicazione. Quindi teoricamente ogni nefrosfera potrebbe essere composta da una sola cellula staminale. Abbiamo osservato che i marcatori di staminalità descritti in letteratura non si possono ritenere validi per la selezione specifica di una sottopopolazione staminale nelle nostre nefrosfere e quindi, non essendo ancora disponibile un pannello di marcatori che definisca le cellule staminali adulte del rene, per studiarne il fenotipo e per poterle poi individuare direttamente sul tessuto, è necessario isolare le cellule staminali dalle nefrosfere utilizzando il colorante fluorescente PKH26. Come già mostrato in figura 7, possiamo identificare all'interno delle nefrosfere cellule in attiva proliferazione che non ritengono il colorante e cellule in stato di quiescenza o a basso tasso di replicazione che risultano fluorescenti.

Per l'isolamento delle cellule staminali, il tessuto renale normale è stato processato come già descritto e le cellule ottenute sono state colorate con PKH26 e piastrate in condizioni non aderenti, in assenza di siero e con i fattori di crescita descritti. Le nefrosfere secondarie ottenute, in cui è stato possibile osservare al microscopio una minoranza di cellule più intensamente fluorescenti, sono state disgregate ottenendo una popolazione di cellule singole che sono state analizzate al FACS (Figura 20).

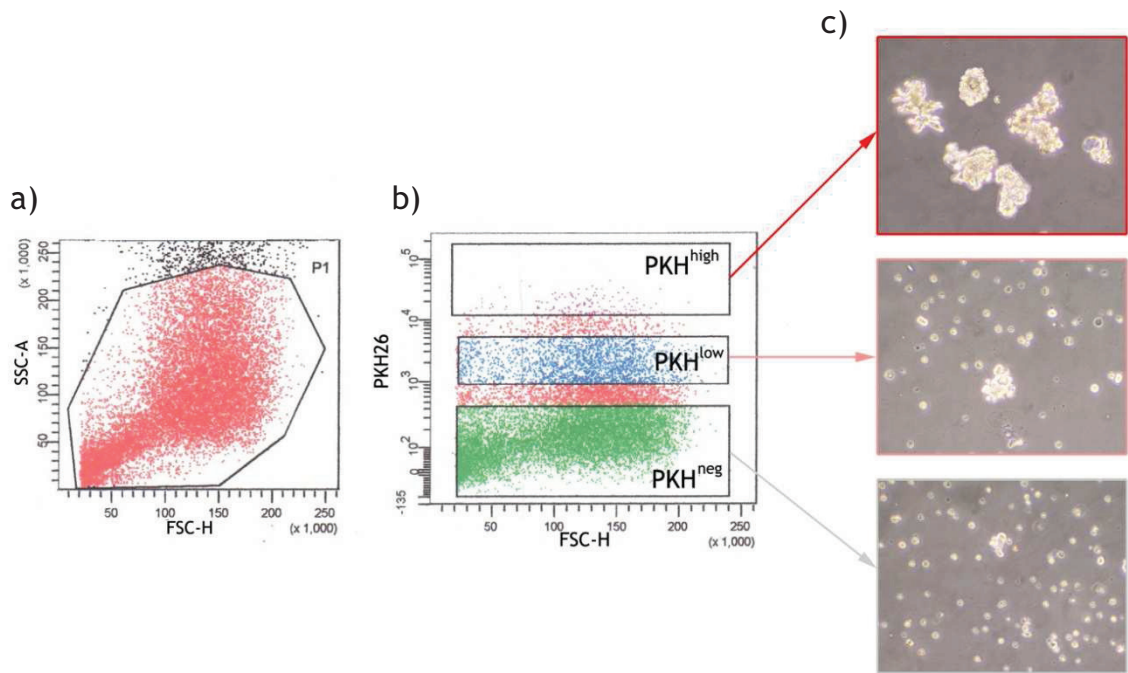


Figura 20: a) analisi al FACS delle cellule che costituiscono le nefrosfere normali; b) identificazione e separazione delle tre popolazioni PKH; c) coltura delle tre popolazioni separate in condizioni non aderenti e in assenza di siero.

Il FACS identifica tre popolazioni cellulari aventi differenti intensità di colorazione fluorescenza:

- Le cellule più intensamente fluorescenti, PKH^{high} , che rappresentano lo 0,5-1% della popolazione totale;
- Le cellule con un'intensità di fluorescenza intermedia, PKH^{low} , che rappresentano il 15-20% della popolazione totale;
- Le cellule non fluorescenti, PKH^{neg} , che rappresentano il 50-60% della popolazione totale.

Le tre popolazioni sono state separate mediante *cell sorting* e ripiastrate in condizioni non aderenti e in assenza di siero. Dopo 10 giorni solamente la popolazione PKH^{high} era in grado di formare nefrosfere. La popolazione PKH^{low} ha originato aggregati di cellule non propagabili per ulteriori passaggi e la popolazione PKH^{neg} non ha generato né sfere né aggregati cellulari (Figura 24c)). La popolazione PKH^{high} è in grado di generare sfere con un'efficienza pari al 9,2%, nettamente superiore rispetto a quella ottenuta piastrando la popolazione cellulare totale (SFE: 0,74%). Questo dato risulta in linea con

quanto è riportato in letteratura [Cicalese, 2009]. Inoltre le sfere ottenute dalla popolazione PKH^{high} sono propagabili in vitro per almeno 7 passaggi. Questo esperimento permette di concludere che la frazione PKH^{high} è costituita da una popolazione arricchita di cellule staminali con la capacità di self-renewal e in grado di formare nefrosfere in vitro.

MATERIALI E METODI

CASISTICA

I pazienti affetti da carcinoma renale sono stati arruolati nella casistica solamente se affetti da carcinoma renale a cellule chiare o papillare. Le caratteristiche clinico-patologiche di tali pazienti sono riportati nella tabella 5.

Paziente	Sesso	Età alla Dx	Dx	Dimensioni tumore (cm)	pT	G	NEFROSFERE	
							Rene Normale	RCC
1RGG	M	77	RCC-cc	5	1b	2	+	+
2IG	M	61	RCC-cc	7,5	3b	3	+	+
3MG	M	59	RCC-cc	6	3a	3	+	+
4MM	F	68	RCC-pap tipo 1	3,5	1a		+	+
5RE	M	77	RCC-cc	5	3a	2	+	1°
6PF	M	77	RCC-cc	8	2	2	c.b.	c.b.
7CE	M	82	RCC-cc	5,8	3a	3	+	-
8VP	M	68	RCC-pap tipo 2	6,8	1b		+	+
9MC	F	82	RCC-cc	7,5	2	2	+	1°
10TE	M	62	RCC-cc	6	1b	3	c.b.	c.b.
11EM	F	72	RCC-cc	4	3a	2	+	+
13AG	M	77	RCC-cc	3,8	3a	2	+	+
14NF	M	54	RCC-cc	15	3b	3	+	-
16OL	M	67	RCC-cc	7,3	3a	2	+	+
17LA	F	78	RCC-cc	15	3b	3	+	+

Tabella 5: Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti affetti da RCC arruolati nella casistica e esito dell'allestimento di "nefrosfere".

Dx: Diagnosi

+ Coltura propagata oltre la terza generazione

- Mancata formazione di nefrosfere

1° Formazione solo di nefrosfere primarie

c.b. Contaminazione batterica

PREPARAZIONE DI SOSPENSIONI A SINGOLE CELLULE DA CAMPIONI DI RENE NORMALE E TUMORALE

Dopo nefrectomia totale o parziale, frustoli di rene normale (corticale e midollare) e tumorale sono stati mantenuti in DMEM freddo contenente 1% di penicillina/streptomicina, 1% di fungizone, 1% di L-glutammina e 10% di FBS a 4°C fino al processamento che deve essere fatto entro le 24 ore. I tessuti sono stati lavati 4 o 5 volte in PBS pH 7,2 e disgregati meccanicamente con bisturi in modo da ottenere piccoli frammenti. Questi frammenti vengono trasferiti in falcon da 50 ml e trattati con un volume adatto di collagenasi di tipo IV (1,25 mg/ml di DMEM/F12) (SIGMA - Aldrich) a 37°C per 2 ore vortexando ogni 15 minuti. Dopo inattivazione della collagenasi con terreno completo, i tessuti digeriti sono stati lavati con PBS due volte e filtrati in setacci da 150 µm per eliminare lo stroma e in seguito passati in aghi da 21 G per ottenere una sospensione a singole cellule che è stata in seguito raccolta per centrifugazione a 1500 rpm.

Si è poi effettuata la lisi dei globuli rossi mediante shock osmotico per aggiunta al pellet di NH₄Cl 0,8% e incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo aggiunta di PBS, si è centrifugato il tutto a 1500 rpm e il pellet cellulare è stato risospeso nell'apposito terreno di coltura (Stem Medium) costituito da DMEM/F12 (Sigma-Aldrich) con l'aggiunta di insulina 5 µg/ml, tranferrina 5 µg/ml, selenio 5 ng/ml, idrocortisone 36 ng/ml, triiodotironina 40 pg/ml, EGF 20 ng/ml, FGF 20 ng/ml (Sigma-Aldrich) e B27 1x (Invitrogen). Le cellule sono state quindi piastrate per 24 ore su piastre aderenti ad una densità di 10000 cellule/ml per selezionare la popolazione epiteliale ed eliminare le cellule che normalmente crescono in sospensione.

ALLESTIMENTO DI COLTURE PRIMARIE EPITELIALI DERIVANTI DA RENE NORMALE E CARCINOMA RENALE

Per ottenere colture primarie epiteliali di rene normale e tumorale, le cellule ottenute in seguito al processamento del tessuto, descritto nella precedente sezione, sono state coltivate su piastre aderenti in terreno DMEM con glucosio 100 mg/dl (Euroclone) e con l'aggiunta del 10% di siero. Un'approfondita caratterizzazione della composizione cellulare di queste colture primarie è stata oggetto di una nostra recente pubblicazione [Bianchi, 2009].

COLORAZIONE CON PKH

Dopo 24 ore dalla piastratura in adesione, le cellule ottenute in seguito al processamento descritto nella sezione relativa sono state staccate dalla piastra con tripsina e sottoposte a colorazione con il colorante fluorescente di membrana PKH2 (verde) o PKH26 (rosso) (Sigma-Aldrich). Nel dettaglio le cellule staccate dalle piastre sono state lavate una volta in PBS, centrifugate a 1300 rpm e in seguito risospese in 1 ml di diluente A (se marcate con PKH2) o diluente C (se marcate con PKH26) (2×10^6 cellule per 1 ml di diluente). Alla soluzione è stato aggiunto un uguale volume di colorante PKH (4×10^{-6} M). Il tutto è stato incubato 4 minuti a temperatura ambiente. Per arrestare la reazione è stato aggiunto un uguale volume di siero. La sospensione cellulare è stata quindi incubata 1 minuto a temperatura ambiente miscelando periodicamente i campioni quindi centrifugata 10 minuti a 1300 rpm. Le cellule del pellet sono state poi lavate 2 volte nel Stem Medium, contaminate e piastrate alla concentrazione di 10000 cellule/ml in multiwell da 6 pozzetti precedentemente trattati con PolyHema (Sigma-Aldrich) per impedire l'adesione delle cellule alla plastica e favorire la coltura di sfere in sospensione. Un campione di cellule è stato analizzato al citofluorimetro (FACS) per verificare l'avvenuta colorazione.

COLTURA DI NEFROSFERE

Dopo 10 giorni dalla piastratura si può osservare la formazione di aggregati sferici in sospensione. E' stata valutata l'efficienza di formazione delle sfere, calcolata come segue:

$$SFE = \frac{n^{\circ} \text{ sfere ottenute}}{n^{\circ} \text{ cellule piastrate}} \times 100$$

La SFE è stata calcolata su quattro pozzetti applicando poi la media matematica.

Per la propagazione delle sfere in coltura, la sospensione cellulare è stata raccolta e centrifugata a 1300 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato poi risospeso nella soluzione enzimatica TrypleExpress (Invitrogen) in un volume pari a 5 ml per ogni sospensione cellulare raccolta da una multiwell e incubato per 5 minuti a 37°C per favorire la disgregazione delle sfere. L'azione dell'enzima è stata poi bloccata aggiungendo un uguale volume di Stem Medium. Per ottenere con sicurezza una sospensione di singole cellule è stata inoltre effettuata una disgregazione meccanica utilizzando una siringa dispensatrice. Una volta ottenuta una sospensione omogenea di cellule singole, che richiede un trattamento meccanico più prolungato per le nefrosfere normali, le cellule sono state in camera di Thoma. Le cellule sono state quindi ripiastrate, ad una concentrazione di 10000 cellule/ml, in Stem Medium in multiwell da 6 pozzetti trattati con Poly-Hema.

La valutazione della morfologia cellulare è stata effettuata utilizzando il microscopio a contrasto di fase invertito Olympus CK40 equipaggiato con obiettivi 4X, 10X e 20X e oculare ad ingrandimento 10X e acquisite con Olympus Digital camera C-4040ZOOM.

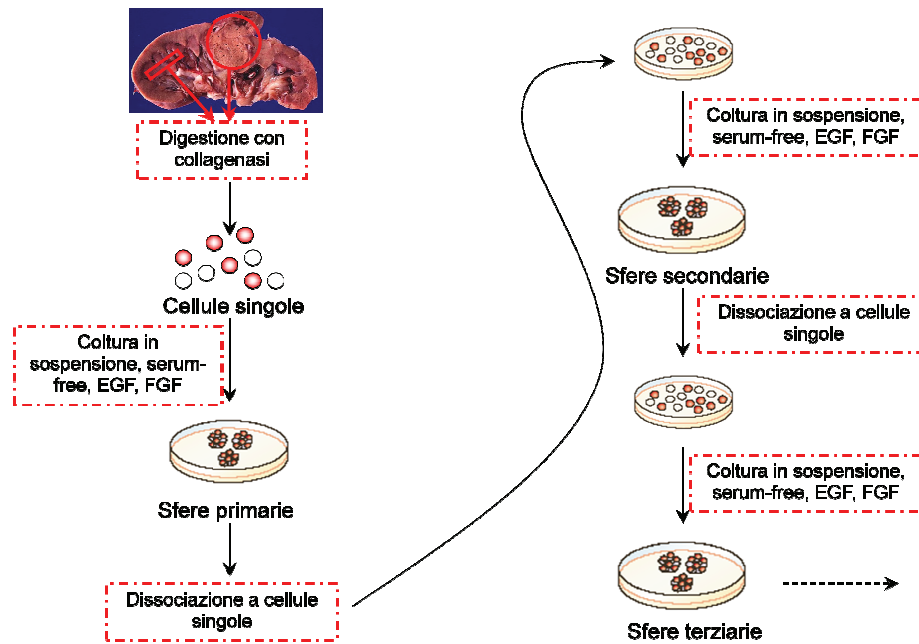


Figura 21: Protocollo di allestimento e coltura di nefrosfere da tessuto renale normale e carcinoma renale

IMMUNOFLUORESCENZA

Per verificare l'espressione di marcatori sulle sfere in toto è stato utilizzato un saggio di immunofluorescenza.

Per il fissaggio delle sfere in sospensione sul vetrino è stata utilizzata la tecnica del citospin, che permette l'adesione cellulare al vetrino per forza centrifuga. Nell'apposita centrifuga da citospin sono stati inseriti 100-300 μ l di sospensione cellulare contenente circa 20-30 sfere per vetrino. Il rotore è stato azionato a 500 g per 15 minuti.

Una volta preparati, i vetrini sono stati trattati per la marcatura.

I vetrini sono stati incubati 15 minuti con una soluzione contenente BSA 1% e Triton X-100 0,6% e in seguito incubati per 2 ore a 4°C con i seguenti anticorpi primari di topo alle seguenti diluizioni: anti-PanCitocheratina, 1:200 (Dako), anti-Vimentina, 1:200 (Dako), anti-CD13 già coniugato con FITC, 1:25 (Chemicon), anti-Calbindina D, 1:50 (Sigma-Aldrich), anti-E-Caderina, 1:50 (BD Bioscience), α -SMA, 1:75 (abcam).

Dopo tre lavaggi in PBS è stata effettuata l'incubazione per 1 ora al buio e a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario anti IgG di topo coniugato con Alexa Green 488 (Invitrogen, Molecular Probes) diluito 1:100. Per la

visualizzazione dei nuclei, si è aggiunto alla soluzione di lavaggio il colorante nucleare DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Sigma-Aldrich) in concentrazione 1 μ M. Come controllo negativo della marcatura in immunofluorescenza, alcuni vetrini sono stati sottoposti agli stessi trattamenti con l'esclusione dell'incubazione con l'anticorpo primario. Sul vetrino è stato montato un vetrino copri oggetto tramite un agente montante con alcol polivinilico e DABCO (Sigma-Aldrich).

Lo stesso protocollo di marcatura è stato utilizzato per la caratterizzazione delle cellule ottenute dalle nefrosfere in cui è stato indotto il differenziamento verso il fenotipo epiteliale o neuronale utilizzando anche i seguenti anticorpi primari: di topo anti-MAP2 (abcam), 1:50, anti-Tubulina, 1:25 (Invitrogen) e di coniglio anti-NF200, 1:50 (abcam) e gli anticorpi secondari anti IgG di topo o di coniglio coniugati rispettivamente con Alexa Green 488 o Alexa Red 594 (Invitrogen, Molecular Probes), 1:100. Per la visualizzazione del citoscheletro di actina al termine dell'incubazione con l'anticorpo secondario, i vetrini sono stati incubati per 15 minuti a temperatura ambiente con Alexa Fluor 594 phalloidin (Invitrogen, Molecular Probes) diluita 1:40 in PBS 1X. I vetrini così preparati sono stati in seguito osservati con obiettivo 40X al microscopio a fluorescenza invertito Zeiss Axiovert 200 equipaggiato di camera Cool SNAP HQ. Il software *Metamorph* ha permesso l'acquisizione, la visualizzazione e l'analisi dei risultati. Il vetrino delle nefrosfere normali marcato con la Citocheratina è stato osservato con l'ingrandimento 60X al microscopio confocale a fluorescenza Nikon ECLIPSE E600 equipaggiato di camera Laser Scanning System Radiance 2100 (Biorad), collegata ad un pc fornito del software "Laser Sharp 2000", per la visualizzazione e l'analisi delle immagini.

ANALISI IMMUNOFENOTIPICA TRAMITE FACS

Le sfere secondarie vengono disgregate come descritto in precedenza ottenendo una sospensione di cellule singole. Per la valutazione dell'espressione di marcatori di membrana, dopo centrifugazione a 1300 rpm per 5 minuti le cellule sono state incubate con 1 ml di soluzione FACS (FCS 5%, NaN₃ 0,1% in PBS) e in seguito incubate con l'anticorpo primario d'interesse

appositamente diluito per 15 minuti al buio, se l'anticorpo è già coniugato al fluorocromo, e a temperatura ambiente. I campioni marcati con anticorpi di membrana già coniugati ad un fluorocromo sono stati analizzati direttamente al FACS.

Le cellule in cui si indaga l'espressione di proteine intracitoplasmatiche sono state invece centrifugate a 1300 rpm per 5 minuti e incubate per 15 minuti con la soluzione FACS. In seguito le cellule sono state fissate con 100 µl di PFA 4%, lavate con 1 ml di soluzione FACS e centrifugate a 1300 rpm per 5 minuti. A questo punto le cellule sono state incubate con gli anticorpi primari che riconoscono marcatori citoplasmatici diluiti nella soluzione FACS contenente Saponina 0,1% (Sigma-Aldrich) per 15 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state poi lavate con 1 ml di soluzione FACS, centrifugate a 1300 rpm per 5 minuti, e incubate per 30 minuti a 4°C al buio con l'anticorpo secondario anti IgG di topo coniugato al fluorocromo Alexa 488, diluito 1:100 nella soluzione FACS contenente Saponina 0,1%. Terminato il tempo di incubazione tutti i tubi vengono lavati con 1 ml di soluzione FACS, centrifugati a 1300 rpm per 5 minuti, risospesi in PBS e conservati a 4°C fino al momento della lettura al citofluorimetro.

Gli anticorpi monoclonali prodotti in topo utilizzati al FACS sono i seguenti: Anti-PanCitocheratina (Dako), anti-CD24 (Biolegend), anti-CD44 (Biolegend), anti-CD29 (Biolegend) e anti-CD133 (Milteny Biotech). La fluorescenza dei campioni è stata rilevata dallo strumento FACSCanto e l'acquisizione dei dati con relativa analisi è stata condotta tramite il software FACS Diva (Becton Dickinson).

ESTRAZIONE DI RNA MEDIANTE TRIZOL[®]

Le cellule delle colture primarie normali e tumorali al raggiungimento della semiconfluenza o le cellule singole ottenute dalle sfere dissociate vengono lisate con 1 ml di Trizol[®] (Invitrogen) per 5 minuti a 4°C. In seguito vengono aggiunti, 0,2 volumi di cloroformio e dopo breve agitazione su vortex i campioni vengono centrifugati a 12000 rpm per 15 minuti a 4-8°C. Il sovrantante acquoso viene trasferito in un nuovo tubo a cui vengono aggiunti 0,5 volumi di alcool isopropilico, e il pellet, ottenuto per centrifugazione a

12000 rpm per 10 minuti a 4-8°C, viene lavato con un volume di etanolo al 75%. Infine, il pellet di RNA così ottenuto viene essiccato e risospeso in H₂O precedentemente trattata con DEPC (diethylpyrocarbonate) e dosato mediante spettrofotometro Nanodrop (Thermo Scientific). La qualità e l'integrità dell'RNA era costantemente controllata mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% in 1x TAE (40 µM TRIS acetato pH 8 e 1 µM EDTA).

SINTESI DI CDNA

Un'aliquota di 1 µg dell'RNA estratto è stata retrotrascritta a cDNA in un volume finale di 20 µl in una miscela di reazione contenente:

- a. RT Buffer 1X
- b. dNTP Mix 1X
- c. RT Random Primers 1X
- d. Multiscribe™ Reverse Transcriptase 50U (Applied Biosystems)

La reazione di retrotrascrizione è avvenuta alle seguenti condizioni: 10 minuti a 25°C, 120 minuti a 37°C, 5 minuti a 85°C.

REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

La quantificazione degli amplificati tramite Real-Time PCR si basa sulla possibilità di monitorare la quantità di amplicone che si sta formando attraverso la quantità di fluorescenza che particolari sonde, primers o ampliconi emettono durante la reazione di amplificazione.

Il segnale di fluorescenza aumenta in modo direttamente proporzionale all'aumento della quantità del prodotto di PCR. Quindi registrando la quantità di fluorescenza emessa ad ogni ciclo di amplificazione è possibile monitorare la reazione di PCR nella fase esponenziale in cui abbiamo il primo incremento significativo di prodotto di PCR correlabile alla concentrazione iniziale di target. La ricerca del segnale fluorescente si può attuare con metodiche diverse e tra le diverse chimiche in commercio si è deciso di utilizzare la chimica delle sonde Taqman (Applied Biosystem).

Le sonde Taqman sono sonde lineari completamente complementari alle sequenze target. Questo tipo di sonda ha fluorocromi (reporter e quencher) alle due estremità della sequenza nucleotidica e non emette fluorescenza finché è intatta. Dopo il legame con la sequenza complementare queste sonde vengono idrolizzate durante la reazione di amplificazione dalla DNA polimerasi che separa il reporter dal quencher permettendo così l'emissione di fluorescenza (Figura 22). I fluorocromi più utilizzati per i reporter all'estremità 5' sono FAM (6 - carboxy-fluorescein), TET (6 - carboxy - 4,7,2',7'-tetrachlorofluorescein), JOE (6 - carboxy - 4, 5 - dichloro - 2 , 7 - dimethoxyfluorescein), VIC™; mentre per i quencher si utilizza di solito la marcatura all'estremità 3' con TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) o con Dark Quencher (MGB). Le variazioni di fluorescenza non correlate alla reazione di PCR vengono normalizzate mediante un fluoroforo interno il ROX (6-carbossi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina).

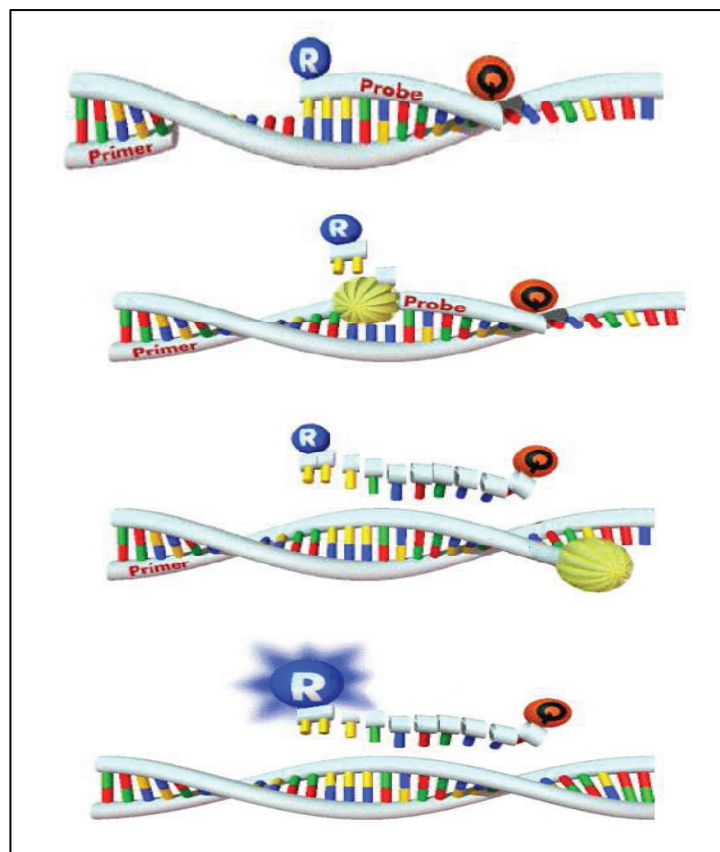


Figura 22: Rappresentazione schematica del funzionamento delle sonde Taqman

TaqMan low density array (TLDA)

Ogni TLDA ha otto porte di caricamento separate che riempiono 48 pozzetti separati per un totale di 348 pozzetti per TLDA (Figura 23). Ogni pozzetto, del volume di 2 μ l, contiene primer e sonde specifici per l'analisi di un singolo gene mediante Real-Time PCR secondo i saggi TaqMan come descritto nella sessione precedente.

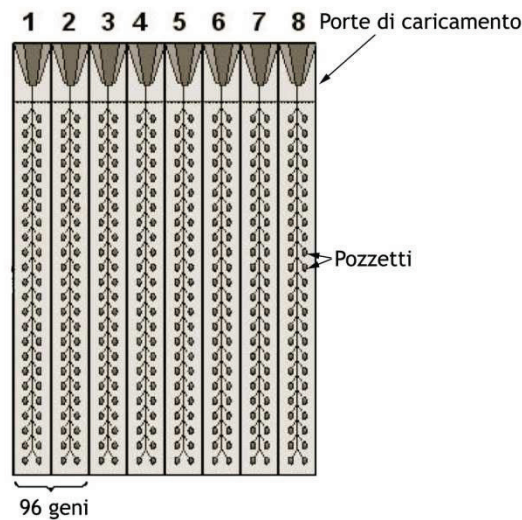


Figura 23: TaqMan low density array

Per i nostri esperimenti sono state utilizzate le TLDA già disponibili in commercio definite Human Stem Cell Pluripotency Panel (Applied Biosystems). Queste contengono 96 geni spottati in quadruplicato appartenenti a 5 classi di geni: 7 geni tipicamente espressi nelle cellule indifferenziate o correlati con il mantenimento della pluripotenza, 34 geni correlati con la staminalità, 50 marcatori di differenziamento e 5 geni housekeeping. I geni studiati e i codici dei rispettivi saggi TaqMan sono elencati nella tabella 6.

Ad ogni campione di cDNA (100 μ l) è stato aggiunto un uguale volume di TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems). Ogni campione è stato poi caricato in duplicato sulla stessa TLDA. La TLDA è stata poi centrifugata due volte per 1 minuto a 1200 rpm (306 x g) per distribuire ogni campione dalla porta di caricamento in ogni pozzetto. La card è stata poi

sigillata e l'amplificazione è stata condotta nel sistema di rilevazione Applied Biosystems Prism 7900HT Fast. Le condizioni del termociclatore erano le seguenti: 2 minuti a 50°C, 10 minuti a 94.5°C, 30 secondi a 97°C, 1 minuto a 59.7°C per 40 cicli.

Gene Symbol	Assay ID	Gene Symbol	Assay ID	Gene Symbol	Assay ID
ACTB	Hs99999903_m1	COMMD3	Hs00201350_m1	GBX2	Hs00230965_m1
FN1	Hs00277509_m1	GFAP	Hs00157674_m1	LIN28	Hs00702808_s1
ISL1	Hs00158126_m1	NES	Hs00707120_s1	SFRP2	Hs00293258_m1
POU5F1	Hs00742896_s1	SYCP3	Hs00538143_m1	COL1A1	Hs00164004_m1
ACTC1	Hs00606316_m1	CRABP2	Hs00275636_m1	GCG	Hs00174967_m1
FOXA2	Hs00232764_m1	GRB7	Hs00917999_g1	MYF5	Hs00271574_m1
KIT	Hs00174029_m1	NEUROD1	Hs00159598_m1	SOX17	Hs00751752_s1
PTEN	Hs00829813_s1	SYP	Hs00300531_m1	18S	Hs99999901_s1
AFP	Hs00173490_m1	CTNNB1	Hs00170025_m1	GCM1	Hs00172692_m1
FOXD3	Hs00255287_s1	HBB	Hs00747223_g1	MYOD1	Hs00159528_m1
KRT1	Hs00196158_m1	NODAL	Hs00415443_m1	SOX2	Hs00602736_s1
PTF1A	Hs00603586_g1	T	Hs00610080_m1	COL2A1	Hs00156568_m1
BXDC2	Hs00217848_m1	DDX4	Hs00251859_m1	GDF3	Hs00220998_m1
GABRB3	Hs00241459_m1	HBZ	Hs00744391_s1	NANOG	Hs02387400_g1
LAMA1	Hs00300550_m1	NOG	Hs00271352_s1	SST	Hs00174949_m1
RAF1	Hs00234119_m1	TAT	Hs00356930_m1	IL6ST	Hs00174360_m1
CD34	Hs00156373_m1	DES	Hs00157258_m1	PAX4	Hs00173014_m1
GAL	Hs00544355_m1	HLXB9	Hs00232128_m1	UTF1	Hs00747497_g1
LAMB1	Hs00158620_m1	NPPA	Hs00383230_g1	FGF4	Hs00173564_m1
REST	Hs00194498_m1	TDGF1	Hs02339499_g1	IGF2BP2	Hs00538956_m1
CD9	Hs00233521_m1	DNMT3B	Hs00171876_m1	PAX6	Hs00240871_m1
GAPDH	Hs99999905_m1	IAPP	Hs00169095_m1	WT1	Hs00240913_m1
LAMC1	Hs00267056_m1	NR5A2	Hs00187067_m1	FGF5	Hs00170454_m1
RUNX2	Hs00231692_m1	TERT	Hs00162669_m1	INS	Hs00355773_m1
CDH5	Hs00174344_m1	LEFTY2	Hs00745761_s1	PECAM1	Hs00169777_m1
GATA4	Hs00171403_m1	IFITM1	Hs00705137_s1	XIST	Hs01079824_m1
LEFTY1	Hs00764128_s1	NR6A1	Hs00265966_m1	FLT1	Hs00176573_m1
SEMA3A	Hs00173810_m1	TFCP2L1	Hs00232708_m1	IPF1	Hs00236830_m1
CDX2	Hs00230919_m1	EEF1A1	Hs00742749_s1	PODXL	Hs00193638_m1
GATA6	Hs00232018_m1	IFITM2	Hs00829485_sH	ZFP42	Hs00399279_m1
LIFR	Hs00158730_m1	OLIG2	Hs00377820_m1	CGB	Hs00361224_gH
SERPINA1	Hs00165475_m1	TH	Hs00165941_m1	EOMES	Hs00172872_m1

Tabella 6: Elenco dei 96 geni contenuti nelle TLDA utilizzate.

Analisi delle TLDA

I valori di espressione genica dopo l'amplificazione sono stati calcolati utilizzando il metodo dei C_T comparativi descritti nell'User Bulletin No. 2 (Applied Biosystems). Questa tecnica utilizza la formula del $2^{-\Delta\Delta CT}$ per calcolare l'espressione del gene target normalizzata secondo un calibratore. Il

ciclo soglia (C_T) indica il ciclo al quale il gene target amplificato raggiunge una threshold fissata. Il valore medio del C_T del gene housekeeping (18S nel nostro caso) è stato sottratto dal valore medio del gene target allo scopo di ottenere il corrispondente valore di ΔC_T . Sono state poi determinate le differenze ($\Delta\Delta C_T$) tra i valori di ΔC_T dei trascritti target nei diversi casi e il valore del corrispondente trascritto della coltura primaria di rene normale scelta come calibratore e queste differenze sono state poi espresse come $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Questo valore rappresenta la quantità di espressione del gene target rispetto ad un calibratore considerato uguale ad 1. Questi calcoli per i 96 geni sono stati effettuati utilizzando il software RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems).

Per la rappresentazione dei risultati è stato utilizzato il software MultiExperiment Viewer (TMEV) inserendo i valori medi dei ΔC_T dei 3 campioni analizzati e l'analisi statistica mediante t-Test è stata condotta con il software MedCalc sulle medie tra i tre campioni analizzati dei ΔC_T di ogni gene.

PROVE DI DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE OTTENUTE DA SFERE NORMALI

Le cellule ottenute dalla disgregazione delle sfere normali come descritto in precedenza sono state coltivate in differenti terreni per valutare la capacità di differenziare in differenti tipi cellulari.

Differenziamento epiteliale

Per ottenere una popolazione differenziata verso un fenotipo epiteliale, le cellule ottenute dalla disgregazione delle sfere normali sono state piastrate su piastre o vetrini che ne consentono l'adesione e in terreno DMEM con Glucosio 100 mg/dl e con l'aggiunta del 10% di siero.

Formazione in vitro di strutture tridimensionali

Per valutare la capacità di formare strutture renali in vitro le cellule sono state coltivate su due differenti substrati semisolidi.

- Il **Collagene di tipo I** derivante dalla coda di ratto (Sigma Aldrich), risospeso come indicato dai produttori, è stato diluito con terreno MCDB 201 10X (Sigma Aldrich) in rapporto 9:1. A 300 µl di questa soluzione sono state aggiunte 10000 cellule e il tutto è stato piastrato in multiwell da 24 pozzetti e incubato per 30 minuti a 37°C per permettere la polimerizzazione del Collagene. In seguito è stato aggiunto terreno DMEM con glucosio 100 mg/dl con l'aggiunta del 10% di siero (Euroclone).
- Il **Matrigel** (Becton Dickinson) è stato utilizzato per diluire le cellule e piastrarle in multiwell da 24 pozzetti (10000 cellule diluite in 300 µl di Matrigel per ogni pozzetto). Le piastre sono state incubate per 30 minuti a 37°C per permettere la polimerizzazione del Matrigel e in seguito è stato aggiunto terreno DMEM con glucosio 100 mg/dl con l'aggiunta del 10% di siero (Euroclone).

Differenziamento neuronale

Le cellule ottenute dalla disgregazione delle sfere normali sono state piastrate su vetrino in DMEM con glucosio 450 mg/dl con l'aggiunta del 10% di siero (Euroclone). Dopo 24 ore, il terreno è stato sostituito con DMEM con glucosio 450 mg/dl e 10% di siero supplementato con B27, EGF 10 ng/ml e FGF2 20 ng/ml. Il terreno è stato cambiato ogni 48 ore.

La valutazione della morfologia cellulare è stata effettuata utilizzando il microscopio a contrasto di fase invertito Olympus CK40 equipaggiato con obiettivi 4X, 10X e 20X e oculare ad ingrandimento 10X e acquisite con Olympus Digital camera C-4040ZOOM.

SORTING DI CELLULE COLORATE CON PKH

Le sfere secondarie ottenute da rene normale sono state disgregate in modo enzimatico e meccanico come descritto precedentemente. Le cellule sono

state quindi contate e risospese in Stem Medium. I campioni sono stati quindi analizzati al FACS e suddivisi in tre popolazioni a diversa intensità di fluorescenza per PKH mediante Cell Sorter (FACS Aria Becton Dickinson). La separazione delle tre popolazioni PKH è stata effettuata definendo in modo arbitrario un cut-off. In particolare le cellule chiamate PKH^{high} sono state identificate al di sopra della quarta decade di fluorescenza e costituiscono lo 0,5-1% della popolazione, in linea con i valori di SFE, la popolazione PKH^{neg} distribuisce entro le prime 2-3 decadi di fluorescenza e corrisponde al 60-70% della popolazione, infine la popolazione PKH^{low} è stata identificata tra le due precedenti, tra la seconda e la quarta decade, e rappresenta il 10-15% della popolazione.

Le tre popolazioni separate sono state ripiastrate in Stem Medium su piastre non aderenti per valutare l'efficienza di formazione delle sfere.

DISCUSSIONE

Il lavoro presentato in questa tesi ha descritto una metodica alternativa per l'isolamento di cellule staminali adulte da rene normale e carcinoma renale. Ad oggi non è ancora chiaramente dimostrata l'esistenza di una popolazione staminale residente nel rene e di una popolazione iniziante il tumore nel RCC. La loro identificazione potrebbe da una parte aprire la strada alla medicina rigenerativa per le patologie renali e dall'altra migliorare la conoscenza della biologia del carcinoma renale favorendo la definizione di nuove ipotesi patogenetiche e lo sviluppo di nuovi marcatori e terapie.

I lavori presenti in letteratura che descrivono l'identificazione di una popolazione staminale nel rene adulto e nel carcinoma renale utilizzando marcatori di superficie [Bussolati, 2006; Sangrinati, 2006; Bruno, 2008]. I marcatori di superficie non possono essere usati in ogni situazione in quanto ad oggi non sono ancora disponibili marcatori staminali universali e specifici. Inoltre gli autori definiscono le cellule da loro identificate come progenitori e non cellule staminali e non è chiaro se queste rappresentino cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo, migrate e insediate definitivamente nel rene, oppure cellule staminali adulte renali residenti.

Per ovviare a questi problemi abbiamo utilizzato un approccio di tipo funzionale per l'isolamento di cellule staminali dal rene normale e dal carcinoma renale; tale metodo, già abbondantemente descritto in letteratura per altri tessuti, permette la selezione, in apposite condizioni di coltura, di una popolazione arricchita in cellule staminali che cresce formando sfere in sospensione, da noi chiamate "nefrosfere".

Tale metodica ha permesso l'allestimento di nefrosfere da tessuto renale normale e tumorale da una casistica di 15 pazienti, con una resa pari a 86,7% per il tessuto normale, in cui gli unici rari problemi nell'allestimento delle nefrosfere erano legati alla contaminazione batterica, e pari al 60% per i tumori, dato in linea con quanto descritto in letteratura dove è riportato che non tutti i tumori sono in grado di dare origine sfere. Per il tumore alla mammella, ad esempio, è descritto che solamente 7 casi su 16 erano in grado

di originare sfere in coltura e solamente le sfere ottenute da 3 di questi 7 casi potevano essere propagate in coltura per lungo tempo. Questo dato correlava con la positività dei tumori d'origine per il recettore degli estrogeni [Ponti, 2005]. Nel nostro studio non abbiamo osservato nessuna correlazione tra la capacità dei nostri tumori di formare nefrosfere propagabili in coltura per lungo tempo e le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti. Probabilmente l'ampliamento della casistica potrà aiutare nell'interpretazione di questi dati.

Le nefrosfere primarie ottenute dal tessuto normale e tumorale, disgregate a singole cellule, mostrano la capacità di generare nuove nefrosfere per molte generazioni con un'efficienza di formazione delle sfere che rimane inalterata con i passaggi. Quindi il numero delle cellule staminali all'interno delle piastre di coltura non varia con i passaggi e corrisponde circa all'1% della popolazione cellulare totale che andando incontro a divisione asimmetrica è in grado di autorinnovarsi. L'utilizzo dei coloranti fluorescenti di membrana PKH ci ha permesso di dimostrare l'origine clonale delle nostre nefrosfere e la presenza all'interno di esse di una popolazione eterogenea costituita da cellule quiescenti, che sono le staminali con la capacità di self-renewal, e da cellule in attiva proliferazione, che sono i progenitori già più differenziati. Semplicemente osservando la morfologia delle nefrosfere e la distribuzione cellulare del PKH all'interno delle sfere possiamo notare delle differenze tra nefrosfere ottenute da tessuto normale e tumorale. Le nefrosfere ottenute da tessuto tumorale risultano meno compatte, meno definite e si osservano differenze morfologiche tra i diversi casi. Anche l'espressione del PKH è differente: le sfere normali concentrano il colorante al centro, mentre le cellule più intensamente fluorescenti all'interno delle nefrosfere tumorali sono distribuite in diverse posizioni nella nefrosfera. Tali diversità possono dare indicazioni sulle caratteristiche di crescita differenti tra cellule staminali normali e tumorali; è infatti probabile che le cellule staminali tumorali, a differenza di quelle normali, alternino divisioni simmetriche e asimmetriche durante lo sviluppo neoplastico, favorendo in molti casi quelle simmetriche [Morrison, 2006]. Questo fatto potrebbe giustificare la differente distribuzione del colorante PKH nelle due popolazioni di sfere.

Le cellule che costituiscono le nefrosfere derivanti da tessuto normale e tumorale esprimono i marcatori delle cellule epiteliali in coltura, Citocheratina e Vimentina, i marcatori del tubulo prossimale e distale, CD13 e Calbindina D, e marcatori modulati durante la transizione epiteliale mesenchimale (EMT), E-Caderina e α -SMA. L'espressione di questi marcatori nelle colture primarie derivanti da tessuto renale normale e tumorale è stata ben documentata nel nostro laboratorio, che negli ultimi anni si è estesamente occupato della caratterizzazione di tali colture che possono fornire un buon modello per lo studio delle differenze presenti tra il fenotipo normale e tumorale. L'analisi con microscopio a fluorescenza invertito delle nefrosfere marcate con gli anticorpi diretti contro le proteine sopra citate dopo citospin non in grado di dimostrare se l'espressione di tali marcatori è omogenea o meno all'interno delle sfere. Lo studio dell'espressione della Citocheratina nelle nefrosfere normali è condotto anche al microscopio confocale in cui non si osserva una colocalizzazione tra l'espressione della Citocheratina e del PKH e l'espressione della Citocheratina è confinata alle cellule più esterne della sfera. Le cellule quiescenti, più intensamente PKH fluorescenti, non esprimono la Citocheratina, a dimostrazione del fatto che le cellule staminali quiescenti all'interno della sfere mantengono uno stato indifferenziato, mentre i progenitori in attiva replicazione, e quindi PKH negativi, sono già *committed* verso una precisa linea differenziativa, in particolare quella epiteliale, essendo Citocheratina positivi. Risulta quindi necessario approfondire l'espressione di tutti i marcatori analizzati mediante microscopio confocale, sia per valutare la loro distribuzione all'interno della sfera, sia per valutare l'eventuale presenza di cellule che esprimono contemporaneamente marcatori di differenziamento diversi. Sarà interessante ad esempio valutare se esistono cellule all'interno della sfera che esprimono nello stesso momento marcatori del tubulo prossimale e distale, oppure marcatori tubulari e podocitari. Tale risultato potrebbe dimostrare l'elevato potenziale differenziativo delle nostre cellule staminali.

Avendo quindi dimostrato che le sfere contengono una popolazione di cellule indifferenziate in grado di autorinnovarsi è stata valutata l'espressione di marcatori di staminalità già descritti in letteratura per l'isolamento di cellule

staminali in diversi tessuti, come CD133, CD24, CD44, CD29. L'espressione di tutti questi marcatori, tranne quella del CD133, risulta molto elevata ed omogenea nelle cellule che compongono le colture primarie, mentre diminuisce in percentuale nelle cellule che compongono le sfere. Queste differenze di espressione potrebbero essere influenzate dalle differenti condizioni di coltura tra i due modelli cellulari, quali la presenza o l'assenza di siero e le condizioni di aderenza o meno. Infatti CD44, CD24 e CD29 sono molecole di adesione la cui espressione potrebbe essere più elevata in cellule che crescono adese alla piastra; inoltre essi sono recettori, la cui espressione potrebbe essere modulata dalla presenza o meno di fattori contenuti nel siero aggiunto al terreno di coltura. E' comunque noto che la crescita in vitro e la presenza di particolari condizioni di coltura possono modificare l'espressione di proteine specifiche. Questi risultati rafforzano comunque l'idea che i marcatori di superficie non possano essere utilizzati in qualunque situazione e nel nostro modello i marcatori di staminalità comunemente descritti non risultano essere validi.

I risultati dell'analisi dell'espressione di 96 geni correlati con la staminalità o con il differenziamento verso specifici fenotipi cellulari ci hanno permesso di fare diverse considerazioni. In primo luogo è possibile valutare quali sono i trascritti che rendono le sfere differenti dalle colture primarie, non solo come effetto delle differenti condizioni di coltura, ma come risultato della modulazione dell'espressione di geni specifici che permettono di affermare la presenza di un fenotipo staminale all'interno delle sfere. Molti dei geni differenzialmente espressi tra le sfere e le colture primarie sono geni comunemente espressi nelle cellule staminali e coinvolti con il mantenimento della pluripotenza o dello stato indifferenziato nelle cellule staminali embrionali. Affinchè la pluripotenza e il self renewal siano mantenuti, è indispensabile l'attivazione del gene Oct4, garantita a sua volta da altri geni quali FoxD3, Sox2 e Nanog. Le cellule staminali pluripotenti che differenziano perdono l'espressione di questi geni e acquisiscono l'espressione di geni di differenziamento specifici. E' poi possibile che le cellule differenziate recuperino lo stato di pluripotenza riprogrammandosi in modo da riattivare questi geni specifici [Pei, 2009]. Comunque l'espressione accoppiata dei

fattori di trascrizione Nanog e Oct4 (Pou5f1) è indispensabile per il mantenimento della pluripotenza e della capacità di self-renewal delle cellule staminali embrionali e delle cellule staminali adulte. In linea con queste osservazioni le nefrosfere ottenute da tessuto normale e tumorale esprimono alti livelli di Nanog e Oct4.

Nelle nostre nefrosfere l'attivazione di Nanog e Oct4 insieme all'espressione di altri geni quali ad esempio la β -catenina potrebbero attivare una serie di pathway che portano al mantenimento della pluripotenza e del self-renewal e che quindi definiscono un fenotipo staminale nelle cellule che compongono le sfere. Ad esempio la β -catenina è coinvolta nel pathway di Wnt che nelle nostre sfere potrebbe essere attivato e che insieme all'espressione dei fattori di trascrizione prima descritti mantiene la pluripotenza e il self-renewal (Figura 24).

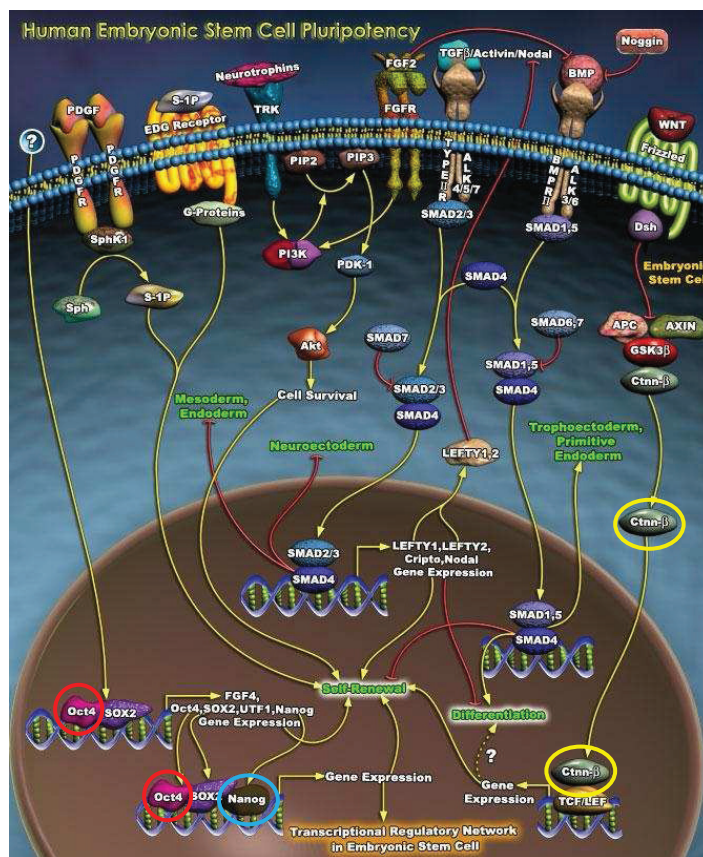


Figura 24: Pathways di mantenimento della pluripotenza nelle cellule staminali embrionali. In evidenza la β -catenina, coinvolta nel pathway di Wnt, Nanog e Oct4, tutti overespressi nelle nostre nefrosfere.

Alcuni dei geni overespressi nelle sfere possono darci indicazioni sulla loro composizione, come la famiglia delle laminine (LAMA1, LAMB1 e LAMC1) più espressa nelle sfere normali rispetto alle colture primarie. L'elevata espressione di proteine della matrice extracellulare nelle sfere normali potrebbe spiegare la difficoltà nel disgregarle e la conseguente necessità di utilizzare un sistema sia enzimatico che meccanico a tale proposito. I nostri dati evidenziano che nelle sfere tumorali si ha una diminuzione dell'espressione delle laminine ed un incremento di quella del collagene che potrebbe rendere ragione della diversa morfologia tra nefrosfere normali e tumorali.

L'analisi delle differenze di espressione dei geni studiati ci ha anche permesso di valutare alcune delle differenze non strettamente legate alla morfologia. Non è ancora chiaro quale possa essere l'origine delle cellule staminali tumorali, se quella di cellule staminali adulte che hanno accumulato mutazioni in grado di conferire un fenotipo tumorigenico piuttosto che quella di cellule somatiche che hanno accumulato mutazioni che permettono la riacquisizione di un fenotipo staminale e tumorigenico allo stesso tempo. Oct4 risulta maggiormente espresso nelle nefrosfere tumorali rispetto alle normali; possiamo ipotizzare quindi che eventi mutazionali a cellule staminali renali normali o a cellule somatiche abbiano portato all'alterazione dei geni che controllano l'espressione di Oct4 e quindi ad un'espressione costitutiva di questo gene cardine per il mantenimento della pluripotenza e del self-renewal. L'elevata espressione di questo gene, sicuramente coadiuvata da altri meccanismi che saranno da approfondire, potrebbe favorire il mantenimento di una popolazione cellulare in grado di originare il tumore e mantenerne lo sviluppo neoplastico.

Un'ulteriore conferma della presenza di cellule staminali nelle nostre nefrosfere è la capacità di queste cellule di differenziarsi in diversi fenotipi cellulari. Gli esperimenti effettuati sulle cellule derivanti da nefrosfere normali coltivate in un terreno specifico hanno mostrato la capacità di queste cellule di differenziare verso un fenotipo epiteliale. Le cellule infatti finiscono per esprimere i marcatori epiteliali e del tubulo prossimale e sono in grado di formare strutture tridimensionali simili a tubuli e glomeruli se

coltivate in substrati semisolidi. Tali strutture andranno meglio caratterizzate per inclusione in paraffina e analisi immunohistochimica.

Dato che l'analisi dell'espressione dei 96 geni ha evidenziato che Nestin, un marcatore di staminalità tipicamente espresso nei progenitori neuronali, ma anche marcatore precoce di differenziamento neuronale e podocitario, risulta maggiormente espresso nelle nefrosfere normali rispetto alle colture primarie normali, abbiamo provato a coltivare le cellule derivate da nefrosfere normali in un terreno adatto per il differenziamento neuronale [Sangrinati, 2006]. Osservando la morfologia delle cellule ottenute al microscopio a contrasto di fase non possiamo dire con certezza queste siano di tipo neuronale o podocitario in quanto entrambi questi tipi cellulari mostrano prolungamenti che terminano con dei peduncoli. E' infatti noto dalla letteratura [Kobayashi, 2004] che podociti e neuroni mostrano caratteristiche simili; entrambi mostrano una morfologia ramificata con prolungamenti costituiti da actina e microtubuli, il cui assemblamento è regolato dalla fosforilazione delle proteine MAP. Anche i meccanismi coinvolti nel traffico intracellulare delle vescicole membranose e nell'assemblaggio degli elementi del citoscheletro sono simili tra i due tipi cellulari. Inoltre podociti e neuroni condividono l'espressione di molte molecole coinvolte nella trasduzione del segnale e nel trasporto trans membrana [Kobayashi, 2004]. Anche i marcatori da noi utilizzati in immunofluorescenza non sono in grado di confermare l'appartenenza ad uno o all'altro fenotipo cellulare. Sono quindi necessari ulteriori esperimenti in grado di determinare se le cellule staminali contenute nelle nefrosfere sono in grado di differenziare in neuroni, podociti o entrambi. La capacità di differenziare in podociti, oltre che a cellule tubulari, potrebbe essere fondamentale per l'utilizzo di queste cellule in medicina rigenerativa nella cura di patologie renali sia da danno tubulo-interstiziale che glomerulare nella fase precoce in cui la funzionalità e l'istologia renale non sono ancora del tutto compromesse rappresentando anche una possibile alternativa alla dialisi e al trapianto d'organo.

La dimostrazione della capacità delle cellule staminali adulte residenti nel rene di differenziare in neuroni confermerebbe la proprietà di plasticità delle nostre cellule staminali.

Gli esperimenti effettuati in questi anni e descritti in questa tesi permettono quindi di affermare che nel tessuto renale normale e tumorale è presente una piccola percentuale di cellule in grado di formare nefrosfere propagabili in coltura per molti mesi e che contengono alcune cellule quiescenti, le cellule staminali, e alcune cellule in attiva replicazione, cioè progenitori già differenziati verso un fenotipo epiteliale. Inoltre alcuni geni tipicamente espressi nelle cellule staminali e coinvolti nel mantenimento della pluripotenza o dello stato indifferenziato sono overespressi nelle nefrosfere normali e tumorali se confrontate con le colture primarie corrispondenti. Inoltre dato che le cellule ottenute dalle nefrosfere normali sono capaci di differenziare in diversi fenotipi cellulari, possiamo concludere che le nefrosfere contengono cellule staminali. Ulteriore conferma di questa ipotesi sono i risultati di un esperimento preliminare di *cell sorting* in cui sono state separate dalle nefrosfere normali tre popolazioni cellulari in base all'intensità di fluorescenza del colorante PKH. Solamente la popolazione cellulare con un'elevata fluorescenza del PKH (PKH^{high}) è in grado di rigenerare sfere in coltura e quindi possiede la capacità di self-renewal.

Risulta quindi fondamentale ora caratterizzare la popolazione PKH^{high} ottenibile dalle nefrosfere normali e tumorali valutandone rispettivamente le capacità differenziative in vitro e rigenerative in vivo in topi immunodepressi in seguito a danno renale e le capacità tumorigeniche in vivo e la risposta ad eventuali terapie in vitro. Sarà inoltre interessante determinare l'esatto fenotipo delle cellule staminali renali normali e tumorali mediante valutazione del profilo trascrittomico tramite microarray e successivamente valutare l'espressione su tessuto tramite Tissue Microarray l'espressione di geni risultati interessanti per individuare la localizzazione delle cellule staminali adulte nel rene e caratterizzare la nicchia in cui risiedono.

La definizione delle differenze tra cellule staminali normali e tumorali del rene potranno essere utili per lo sviluppo di nuove ipotesi patogenetiche del carcinoma renale, per lo sviluppo di nuove terapie mirate alle cellule staminali tumorali e per l'identificazione di nuovi marcatori molecolari.

BIBLIOGRAFIA

- Addla SK, Brown MD, Hart CA et al. "Characterization of a Hoechst 33342 side population from normal and malignant human renal epithelial cells." *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, 295:F680-F687.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:3983-3988.
- Alison MR, Islam S. "Attributes of adult stem cells". *J Pathol* 2009, 217(2):144-60.
- Amato RJ: "Chemoterapy for renal cell carcinoma." *Semin Oncol* 2000, 27:177-86.
- Amin MB, Amin MB, Tamboli P, et al. "Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases." *Am J Surg Pathol*, 2002, 26: 281-91.
- Baer PC, Nockher WA, Haase W, Scherberich JE. "Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation." *Kidney International* 1997, 52:1321-1331
- Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. "Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine". *J tissue Eng Regen Med* 2008, 2:169-183.
- Baldewijns MML, van Vlodrop IJH, et al. "Genetics and epigenetics of renal cell cancer". *Biochimica et Biophysica Acta* 2008, 1785:133-155.
- Batard P, monier MN, Fortunel N et al. "TGB-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation." *J Cell Sci* 2000, 113(Pt3):383-390.
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al. "CD133⁺ and CD133⁻ glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles." *Cancer Res* 2007, 67(9):4010-4015.
- Betschiger J, Knoblich JA. "Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C.elegans* and vertebrates". *Curr Biol* 2004, 14:R674-R685.

- Bianchi C, Bombelli S, Raimondo F et al. "Primary cell cultures from human renal cortex and renal-cell carcinoma evidence a differential expression of AnnexinA3 isoforms." *Am J Pathol* 2009, in press.
- Bodmer D, et al. "Understanding familial and non-familial renal cell cancer." *Hum Mol Genet*, 2002, 11: 2489 -2498
- Bonnet D, Dicke JE. "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nat Med* 1997, 3:730-737.
- Bostwick DG and Eble JN. "Diagnosis and classification of renal cell carcinoma". *Urol Clin North Am* 1999, 26:627-35.
- Bruce WR, Gaag H. "A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo". *Nature* 1963, 199:79-80.
- Bruno S, Bussolati B, Grange C et al. "CD133⁺ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis." *Am J Path* 2006, 169(6):2223-2235.
- Burget P et al. "Molecular differential diagnosis of renal cell carcinomas by microsatellite analysis". *Am J Path* 1996, 194:2081-2088.
- Bussolati B, Bruno S et al. "Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney." *Am J Path* 2005, 166(2):545-555.
- Bussolati B, Bruno S, Grange C, Ferrando U, Camussi G. "Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas." *FASEB J* 2008, 22:3696-3705.
- Challen GA, Bertonecello I, Deane JA et al. "Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity." *J Am Soc Nephrol* 2006, 17(7):1896-1912.
- Cheville JC, et al. "Comparison of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma". *The American Journal of Surgical Pathology*, 2003, 27(5): 612-624
- Chow WH, Devessa SS, et al. "Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 1999, 281:1628-31.
- Cicalese A, Bonizzi G, Pasi C et al. "The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells." *Cell* 2009, 138(6):1083-1095.

- Clevers H. "Stem cells, asymmetric division and cancer". *Nature Genet* 2005, 37:1027-1028.
- Cohen HT, Mc Govern FJ: "Renal cell carcinoma." *N Engl J Med* 2005, 353: 2477-90.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. "Perspective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." *Cancer Res* 2005, 65(23):10946-10951.
- Crossey PA, et al. "Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype". *Hum Mol Genet*, 1994, 3: 1303-8.
- Dal Cin P. "Genetics in renal cell carcinoma." *Curr Opin Urol*, 2003, 13: 463-466.
- Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. "Cancer stem cells: model and concepts." *Annu Rev Med* 2007, 58:267-284.
- Dalerba P, Dylla SJ, Park IK et al. "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104(24):10158-63.
- Delahunt B, Eble JN. "Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors." *Mod Pathol*, 1997, 10: 537-544.
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM et al. "In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells". *Genes & Dev* 2003, 17:1253-1270.
- Duffield JS, Park KM, Hsiao LL et al. "Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells." *J Clin Invest* 2005, 115(7):1743-1755.
- Farnie G, Clarke RB, Spence K, Pinnock N, Brennan K, Anderson NG, Bundred NJ. "Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: role of Notch and epidermal growth factor receptor signaling pathways." *J Natl Cancer Inst* 2007, 99(8):616-27.
- Fidler IJ, Kripke ML. "Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor." *Science* 1977, 197:893-895.

- Forino M, Torregrossa R, Ceol M et al. "TGFbeta1 induces epithelial-mesenchymal transition, but not myofibroblast transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture." *Int J Exp Pathol* 2006, 87(3):197-208.
- Fuchs E et al. "Socializing with the Neighbors: stem cells in their niche". *Cell* 2004, 116: 796-778.
- Galli E, Binda E, Orfanelli U, et al. "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma." *Cancer Res* 2004, 64:7011-7021.
- Givan AL, Fisher JL et al- "A flow cytometric method to estimate the precursor frequencies of cells proliferating in response to specific antigens." *J Immunol Methods* 1999, 230(1-2):99-112.
- Gnarra et al. *Proc Natl Acad Sci USA*,1996, 93: 10589.
- Goodell MA et al. "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo". *J Exp Med* 1996, 183(4):1797-1806.
- Grignon DJ, Che M. "Clear cell renal cell carcinoma". *Clin Lab Med* 2005, 25 (2): 305-16.
- Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA et al. "Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells." *Breast Cancer Res* 2008, 10(3):R52.
- Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. "SP analysis may be used to identify cancer stem cells populations." *Exp Cell Res* 2006, 312(19):3701-10.
- Harper LJ, Piper K, Common J, Fortune F, Mackenzie IC. "Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma". *J Oral Pathol Med* 2007, 36(10):594-603.
- Hemmingsen C. "Regulation of renal calbindin-D28K". *Pharmacol Toxicol* 2000, 87 Suppl 3:5-30
- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. "Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer." *Cell Stem Cell* 2007, 1(3):1102-13.

- Higgins JPT, et al. "Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray" . *Am J. of Pathol* 2003, vol.162(3).
- Hishikawa K, Marumo T et al. "Musculin/MyoR is expressed in kidney side population cells and can regulate their function." *J Cell Biol* 2005, 169(6):921-928.
- Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A et al. "Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury." *Cell Stem Cell* 2008, 2(3):284-291.
- Ikarashi K et al. "Bone marrow cells contribute to regeneration of damaged glomerular endothelial cells". *Kidney Int* 2005, 67:1925-1933.
- Iwatani H, Ito T, Imai E et al. "Hematopoietic and nonhematopoietic potentials of Hoechst(low)/side population cells isolated from adult rat kidney". *Kidney Int* 2004, 65(5):1604-1614.
- Jamel A, Murray T, et al. "Cancer statistics". *CA Cancer J Clin* 2005, 55:10-30
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, et al. "VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche". *Nature* 2005, 438(7069):820-827.
- Kim D et al. "Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia." *J Am Soc Nephrol* 2005, 16:3527-3534.
- Kobayashi N, gao SY, Chen J et al. "Process formation of the renal glomerular podocyte: is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons?" *Anat Sci Int* 2004, 79(1):1-10.
- Kondo T, Setoguchi T, Taga T. "Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line". *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101(3):781-786.
- Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, et al. "The Heidelberg classification of renal cell tumours". *J Pathol* 1997;183:131 -133.
- Kovacs G. "Molecular differential pathology of renal cell tumours". *Histopathology* 1993;22:1-8.
- Lam JS, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS. "Role of molecular markers in the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma". *Urology* 2005, 66 (suppl 5A):1-9.

- Lansdorp PM. "In vitro properties of purified human stem cell candidates." *J Hematother* 1993, 2(3):329-332.
- Leppert JT, Pantuck AJ. "Significance of gene expression analysis of renal cell carcinoma." *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006, 6(2): 293-299.
- Li B et al. "Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model." *Kidney Int* 2006, 69:323-330.
- Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y. "Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis." *Cell research* 2007, 17:3-14.
- Li L, Xie T. "Stem cell niche: structure and function." *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, 21:605-31.
- Lin F et al. "Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice." *J Am Soc Nephrol* 2003, 14:1188-1199
- Linehan WM et al. "Genetic basis of cancer of the kidney: disease-specific approaches to therapy". *Clin Canc Res*, 2004, 10: 6282s-6289s.
- Linehan WM et al. "Genetic basis of cancer of the kidney: disease-specific approaches to therapy". *Clin Canc Res*, 2004, 10: 6282s-6289s.
- Linehan WM, Walther MM, and Zbar B. "The genetic basis of cancer of the kidney". *J Urol* 2003, 170: 2163-2172.
- Lubensky IA, Gnarr JR, et al. "Allelic deletions of the *VHL* gene detected in multiple microscopic clear cell renal lesions in von Hippel-Lindau disease patients". *Am J Pathol*, 1996;149:2089-94.
- Maher ER. "Von Hippel - Lindau disease". *Curr Mol Med*, 2004 Dec, 4(8): 833-42
- Mani SA, Guo W, Liao MJ et al. "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." *Cell* 2008, 133(4):704-15.
- Martel CL, Primo NL: "Renal cell carcinoma: current status and future directions." *Crit Rev Oncol Hematol* 2003, 45(2): 177-90.

- Mazzeinghi B, Ronconi E, Lazzeri E et al. "Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells." *J Exp Med* 2008, 205(2):479-490.
- Mimeault M, Batra SK. "Recent Progress on Tissue-Resident adult Stem Cell Biology and Their Therapeutic Implications". *Stem cell rev* 2008, 4:27-49.
- Moch H., Mihatsch MJ. "Genetic progression of renal cell carcinoma". *Virchows Arch*, 2002, 441: 320-327.
- Morel AP, Lièvre M, Thomas C, Hinkal S, Ansieau S, Puisieux A. "Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition." *PLoS One* 2008, 3(8):e2888.
- Morigi M et al. "Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure". *J Am Soc Nephrol* 2004, 15:1794-1804.
- Morrison SJ, Kimble J. "Asymmetric and symmetric divisions in development and cancer". *Nature* 2006, 441:1068-1074.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D. "Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells". *Neuron* 1994, 13(5):1071-82.
- Novick AC. "Kidney cancer: past, present and future". *Urologic Oncology and Original Investigations* 2007, 25:188-195.
- Ohh M and Kaelin WG Jr. "VHL and kidney cancer". *Methods Mol Bio*, 2003, 222: 167-183.
- Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. "The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells." *J Clin Inv* 2004, 114(6):795-804.
- Pei D. "Regulation of pluripotency and reprogramming by transcription factors". *J Biol Chem* 2009, 284(6):3365-3369.
- Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. "The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation." *J Natl Cancer Inst* 2006, 98(24):1777-85.

- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N et al. "Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor properties." *Cancer Res* 2005, 65(13):5506-5511.
- Rajan P, Srinivasan R. "targeting cancer stem cells in cancer prevention and therapy." *Stem Cell Rev* 2008, 4:211-216.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. "Stem cells, cancer and cancer stem cells." *Nature* 2001, 414:105-111.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells". *Nature* 2007, 445(7123):111-5.
- Rogers C.G., Tan M-H & The B.T. 2005 *Urology* 65: 231-237.
- Russo P: Renal cell carcinoma: presentation, staging and surgical treatment. *Semin oncol* 2000, 27:160-176.
- Sangrinati C, Netti GS, Mazzinghi B et al. "Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys." *J Am Soc Nephrol* 2006, 17:2443-2456.
- Sangrinati C, Ronconi E, Lazzeri E, Lasagni L, Romagnani P. "Stem-cell approaches for kidney repair: choosing the right cells". *Trends Mol Med* 2008, 14(7):277-285.
- Shanmiao G, Tao L, et al. "Establishment of clonal colony-forming assay for propagation of pancreatic cancer cells with stem cell properties". *Pancreas* 2007, 34(4):429-435.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. "Identification of human brain tumor initiating cells". *Nature* 2004, 432:396-401.
- Stocum DL, Zupanc GKH. "Stretching the limits: stem cells in regeneration science". *Dev Dynamics* 2008, 237:3648-3671.
- Storkel S, et al. "Classification of renal cell carcinoma". Workgroup no.1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997;80:987 -989.
- Strutz F, Zeisberg M. "Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease". *J Am Soc Nephrol* 2006, 17:2992-2998

- Thedieck C, Kalbacher H, Kuczyk M, Muller GA, Muller CA, Klein G. "Cadherin-9 is a novel cell surface marker for the heterogeneous pool of renal fibroblasts". *PLoS ONE* 2007, 2(8):e657
- Togel F et al. "Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms." *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, 289:F31-F42.
- Tokar EJ, Ancrile BB, Cunha GR, Webber MM. "Stem/progenitor and intermediate cell types and the origin of human prostate cancer". *Differentiation* 2005, 73:463-473.
- Verfaillie CM et al. "Stem cells: hype and reality". *Hematology* 2002, 369-391.
- Walsh PC et al. Campbell's Urology 8th edition. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sidney, Toronto, Saunders.
- Yamashita YM, Fuller MT, Jones DL. "Signaling in stem cell niches: lessons from the Drosophila germline." *J Cell Sci* 2005, 118:665-672.
- Yoshida M, et al. "Somatic Von Hippel-Lindau disease gene mutation in clear-cell renal carcinomas associated with end-stage renal disease/acquired cystic disease of the kidney." *Genes Chrom & Cancer*, 2002, 35: 359-364.
- Yuan X, Curtin J, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS. "Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme". *Oncogene* 2004, 23(58):9392-9400.
- Zhao RC, Zu YS, Shi Y. "New hope for cancer treatment: exploring the distinction between normal adult stem cells and cancer stem cells." *Pharmacology & Ther* 2008, 119:74-82.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Perego e la Dott.ssa Bianchi per avermi guidata praticamente in tutto quello che ho scritto in questa tesi e per avermi aiutata a crescere in questo lavoro.

Grazie a Ingrid per i consigli sulla parte di analisi trascrittomica, a Roberta per la pazienza e le risposte a tutte le mie domande sul FACS e alla Dott.ssa Bugarin per gli esperimenti di cell sorting e i relativi consigli.

Ringrazio il Prof. Strada per il reclutamento dei pazienti arruolati nello studio descritto in questa tesi e il Dott. Bovo per le analisi anatomo-patologiche dei pazienti e per la disponibilità sempre mostrata.

Ringrazio tutte le persone che in questi tre anni sono passate nel nostro laboratorio per aver condiviso, ognuno a suo modo, un piccolo o un grande tratto di questo percorso; grazie Barbara, Paola, Lara, Valentina, Vitalba, Manuela, Matteo, Grazia e Marianna.

Un grazie sincero a Laura e Francesca perché è bello potersi confrontare con chi è già passato per la tua stessa strada.

Un ringraziamento speciale ad Erica e al suo cervellino stordito perché, anche se non fisicamente, è come se avesse lavorato al mio fianco in questi tre anni e anche a Teo che, insieme a Mauro, ha sopportato le nostre infinite discussioni scientifiche.

Ringrazio i miei genitori e tutta la mia famiglia che mi ha sostenuto e mi sostiene ogni giorno nelle scelte che faccio.

Grazie a tutti gli amici, quelli che non capiranno mai perché ho deciso di fare questo lavoro e quelli che invece lo capiscono, che in ogni caso riescono a farmi sentire sempre il grande calore della loro vicinanza.

E grazie a Mauro che *semplicemente* è e sarà sempre al mio fianco.