



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale

Biologia molecolare e applicata

**Ruolo delle isoforme TAp63 e  $\Delta$ Np63 nel carcinoma mammario**

**Role of TAp63 and  $\Delta$ Np63 isoforms in breast cancer**

Tesi di Laurea Magistrale  
di: Di Cola Giulia

Relatore:  
Prof.ssa Anna La Teana

---

Correlatore:  
Prof. Liborio Stuppia

---

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2018/2019

# INDICE

Capitolo I-INTRODUZIONE	
1.1 Il carcinoma mammario	5
1.1.1 Epidemiologia	5
1.1.2 Fattori di rischio	6
1.1.2.1 Fattori genetici	8
1.1.3 Tipi di cancro alla mammella	10
1.1.4 CM invasivi	12
1.2 Il gene e i suoi prodotti	15
1.2.1 La famiglia di p53: struttura e funzione	15
1.2.2 Ruolo di p63 come fattore di trascrizione	22
1.2.3 Ruolo di p63 nei tumori	25
1.2.3.1 Ruolo di p63 nel CM	27
1.3 Le Cancer Stem Cells (CSCs)	30
1.3.1 Definizione di staminalità	30
1.3.2 La teoria delle CSCs	31
1.3.3 CSCs e carcinoma mammario	36
1.3.4 Ruolo di P63 nella staminalità della ghiandola mammaria	41
Capitolo II-SCOPO DELLA TESI	44
Capitolo III-MATERIALI E METODI	47
3.1 Purificazione e coltura delle CSCs	47

3.2 Delezione selettiva delle due varianti ammino-terminali di p63 (TAp63 e DNp63) e knock-out totale della proteina tramite il sistema CRISPR-Cas9	48
3.2.1 Il sistema CRISPR-Cas9	48
3.2.2 Propagazione dei costrutti di co-espressione per Cas9 e sgRNA	52
3.2.3 Identificazione delle sequenze bersaglio	53
3.2.4 Preparazione e clonaggio degli inserti per le sequenze guida	56
3.2.5 Propagazione e amplificazione di plasmidi in E.coli	59
3.2.6 Trasfezione dei costrutti di co-espressione per Cas9 e sgRNA in BCSC ed isolamento di cloni mutati da singola cellula	62
3.2.7 Analisi di mutazione del locus bersaglio e selezione dei cloni positivi	63
3.3 Western blot per la verifica della delezione selettiva	64
3.4 Saggio di proliferazione cellulare	66
3.5 Analisi citofluorimetrica di marcatori di superficie	66
3.6 Analisi del ciclo cellulare	67
3.7 Esperimento di inoculo in modello animale	68
Capitolo IV-RISULTATI	70
4.1 Caratterizzazione delle linee cellulari ottenute tramite CRISPR-Cas9	70
4.2 Effetto in vivo dell'inoculo di BCSC WT, knock-out per TAp63 o $\Delta$ Np63	74
Capitolo V-DISCUSSIONE	77
Capitolo VI-CONCLUSIONI	81

## Capitolo I

### INTRODUZIONE

Con la definizione di neoplasia (*nuova formazione*) o tumore si indica una patologia causata dalla proliferazione incontrollata di un gruppo di cellule la cui crescita supera in maniera scoordinata quella dei tessuti normali e progredisce anche dopo la cessazione degli stimoli che ne hanno causato l'insorgenza. Tale autonomia proliferativa deriva da alterazioni genetiche responsabili della crescita in maniera indipendente dagli stimoli fisiologici, che vengono trasmesse alla progenie delle cellule neoplastiche.

Infatti, le neoplasie vengono considerate lesioni clonali dal momento che l'intera popolazione di cellule neoplastiche all'interno di un tumore deriva da una singola cellula che ha subito un'alterazione genetica.

La carcinogenesi è un processo multifasico e progressivo a livello fenotipico e genetico, che deriva dall'accumulo di successive mutazioni (Campbell LL. et al.,2007). A livello molecolare, la progressione tumorale e l'eterogeneità associata derivano dall'accumulo di mutazioni genetiche indipendenti nelle diverse cellule, che generano sottoclone con capacità diverse di accrescersi, invadere, metastatizzare e resistere (o rispondere) alla terapia. Quindi, nonostante la maggior parte delle neoplasie maligne sia in origine monoclonale, nel momento in cui il tumore diventa clinicamente evidente le sue cellule presentano un'estrema eterogeneità.

La crescita tumorale viene inoltre definita:

- afinalistica, in quanto priva di utilità per l'ospite;
- atipica, date le anomalie strutturali e funzionali a carico dell'architettura tissutale e delle singole cellule;
- autonoma, in quanto tende a sfuggire ai controlli che regolano la crescita, restando però dipendente dall'ospite per l'apporto nutrizionale, vascolare e ormonale.

In riferimento alle caratteristiche morfologiche delle cellule ed alle modalità di accrescimento e comportamento nei riguardi dei tessuti limitrofi e all'interno dell'organismo, i tumori vengono suddivisi in benigni e maligni.

I tumori benigni sono caratterizzati da una citologia cellulare ben differenziata, che rende riconoscibile il tessuto di origine. L'aumento della massa segue un andamento regolare fino ad arrivare ad uno stadio limite, in maniera espansiva ma compatta, comprimendo i tessuti vicini senza infiltrarli.

Nei tumori maligni, comunemente associati al termine "*cancro*" vero e proprio, la struttura del tessuto di origine viene persa in vario grado così come il differenziamento delle singole cellule, dando luogo a fenomeni di anaplasia e pleomorfismo cellulare. La crescita risulta irregolare nel tempo e con carattere espansivo-infiltrante, mostrando capacità invasiva sia locale che a distanza, dando luogo a metastasi.

Sebbene, tradizionalmente, i geni associati al cancro vengano descritti in base alla loro presunta funzione, è utile considerarli nel contesto delle sette alterazioni fondamentali nella fisiologia cellulare che, insieme, determinano il fenotipo maligno (Stingl J et al.,2007):

- Autosufficienza dei segnali di crescita;
- Insensibilità ai segnali di inibizione della crescita;
- Evasione dall'apoptosi;
- Potenziale replicativo illimitato;
- Angiogenesi protratta;
- Capacità di invasione e di formare metastasi;
- Difetti nella riparazione del DNA: le cellule tumorali possono non riuscire a riparare i danni al DNA causati da agenti cancerogeni o verificatisi durante la proliferazione cellulare incontrollata e ciò porta a instabilità genomica e a mutazioni nei proto-oncogeni e nei geni oncosoppressori.

Quattro diverse classi di geni rappresentano i bersagli delle alterazioni genetiche:

- geni che promuovono la crescita cellulare (proto-oncogeni);
- geni che inibiscono la crescita cellulare (geni oncosoppressori);
- geni che regolano la morte cellulare programmata (apoptosi);
- geni coinvolti nella riparazione del DNA.

Gli alleli mutati dei protooncogeni sono considerati dominanti perché trasformano le cellule anche in presenza dell'allele normale. Al contrario, entrambi gli alleli normali dei geni oncosoppressori devono essere mutati affinché possa verificarsi la trasformazione neoplastica.

La regola prevede tuttavia eccezioni: talvolta la perdita di un singolo allele di un gene oncosoppressore riduce i livelli o l'attività della proteina in maniera sufficiente perché vengano rimossi i freni alla proliferazione e alla sopravvivenza cellulare. La perdita di funzione di un gene causata dal danno a un singolo allele è chiamata aploinsufficienza. Nella funzione normale, infatti, è necessaria la quantità di materiale genetico fornita da entrambi gli alleli (Hanahan D et al.,2000).

I geni che regolano l'apoptosi possono comportarsi come proto-oncogeni o come geni oncosoppressori. Mutazioni a carico dei geni che controllano la riparazione del DNA non trasformano direttamente le cellule agendo sulla proliferazione o sull'apoptosi, ma influenzano la proliferazione o la sopravvivenza della cellula in maniera indiretta, intervenendo sulla capacità di un organismo di riparare lesioni non letali in altri geni, compresi i proto-oncogeni, i geni oncosoppressori e i geni che regolano l'apoptosi. Un'inattivazione dei geni per la riparazione del DNA predispone quindi a mutazioni del genoma e alla trasformazione neoplastica della cellula. La

propensione all'accumulo di mutazioni a carico dei geni per la riparazione del DNA è definita fenotipo mutatore (Hahn WC et al.,2002).

## **1.1 Il Carcinoma mammario**

### ***1.1.1 Epidemiologia***

Il carcinoma della mammella (**CM**) è la neoplasia maligna più frequente nelle donne (25% di tutti i tumori) ed è responsabile del 14,3% delle morti per cancro nel sesso femminile (Globocan, 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality et Prevalence worldwide in 2012, <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>).

In Europa, considerando uomini e donne assieme, l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (AIRC) ha stimato che ogni anno vengono diagnosticati 464.000 nuovi casi (il 99% dei casi nelle donne) (World Cancer Report 2014. Stewart, BW and Wild, CP. <http://publications.iarc.fr/Non-SeriesPublications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>. IARC Press).

In Italia, secondo l'ultima pubblicazione dell'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM) sui numeri del cancro (2018), il CM, con circa 52.800 nuovi casi nel 2018, rappresenta nelle donne la neoplasia più frequente in tutte le fasce d'età sebbene con percentuali diverse (41% delle neoplasie totali diagnosticate nella fascia fino a 49 anni d'età versus il 22% nelle anziane).

In Italia, il CM ha rappresentato nel 2018 la prima causa di morte per tumore nelle donne, con 12.274 decessi, al primo posto anche in diverse età della vita,



rappresentando il 29% delle cause di morte oncologica prima dei 50 anni, il 21% tra i 50 e i 69 anni e il 14% dopo i 70 anni.

Mediamente, per una donna italiana, il rischio di ammalarsi nel corso della vita è oggi del 13%: circa una donna su 45 si ammala entro i 50 anni, una su 19 tra i 50 e i 69 anni, e una donna su 23 tra i 70 e gli 84 anni. (I numeri del Cancro in Italia 2018 [https://www.registritumori.it/cms/sites/default/files/pubblicazioni/2018\\_NumeriCancro-pazienti.pdf](https://www.registritumori.it/cms/sites/default/files/pubblicazioni/2018_NumeriCancro-pazienti.pdf)).

Nel mondo l'incidenza di CM aumenta esponenzialmente con l'età, con un fattore fino a 8 volte più grande nelle popolazioni più ricche occidentali rispetto alle popolazioni più povere del terzo mondo.

### ***1.1.2 Fattori di rischio***

Diversi sono i fattori di rischio che possono influenzare l'insorgenza e lo sviluppo del cancro al seno, in primo luogo l'età (oltre la metà dei casi si riscontra in pazienti con più di 50 anni), seguita da:

- pregressa diagnosi di tumore al seno o alcune patologie mammarie benigne;
- sovrappeso dopo la menopausa;
- trattamento pregresso o in corso con terapia ormonale sostitutiva (TOS);
- uso della pillola anticoncezionale per lungo tempo;
- nulliparità;
- menarca precoce o menopausa tardiva;

- mancanza di latte o allattamento breve;
- prima gravidanza tardiva;
- fattori legati allo stile di vita;
- largo uso di alcolici protratto nel tempo;
- fumo di sigaretta;
- alimentazione ricca di grassi saturi, povera di frutta e verdura;
- fattori genetici.

Il tumore della mammella è prevalentemente sporadico, ossia non associato a mutazioni genetiche che possano predisporre alla malattia. Ciò significa che, pur potendo avere un parente affetto dalla malattia, nella maggior parte dei casi non si fa parte di una 'famiglia a rischio'.

I principali fattori di rischio per il carcinoma della mammella sporadico sono legati all'esposizione ormonale: la maggior parte di queste neoplasie si sviluppa nelle donne dopo la menopausa ed esprime i recettori per gli estrogeni (ER-positiva). L'esposizione ormonale aumenta il numero delle potenziali cellule bersaglio in quanto stimola cicli di proliferazione che espongono le cellule a possibili danni a carico del DNA.

Gli estrogeni possono avere anche un ruolo più diretto nella carcinogenesi. I metaboliti degli estrogeni possono causare mutazioni o generare radicali liberi dannosi per il DNA nelle cellule e nei modelli animali (Murphy et al.,2010).

In casi molto rari, meno di 5 su 100, la malattia è causata da mutazioni genetiche che conferiscono una predisposizione allo sviluppo della malattia. La presenza di un difetto genetico può essere sospettata in presenza di due o più familiari affetti, soprattutto se la malattia è stata diagnosticata in giovane età o ad ambedue le mammelle, oppure in presenza di familiari affetti da altre forme di tumore, in particolare a carico dell'ovaio.

### ***1.1.2.1 Fattori genetici***

Il 5-12% dei CM sono tumori ad esordio precoce in donne con età inferiore ai 45 anni. Essi sono associati ad una predisposizione genetica e all'ereditarietà di geni di suscettibilità mutati, tra cui BRCA1 / BRCA2 (Juwle A. et al.,2012; Antoniou P et al.,2003).

Le mutazioni di BRCA1 e BRCA2 sono responsabili del 25-30% dei carcinomi ereditari e del 3% circa di tutti i carcinomi della mammella (Van den Broek AJ et al.,2015). La penetranza, ossia la percentuale dei portatori che sviluppa un carcinoma della mammella, varia dal 30 al 90% in base all'età e alla specifica mutazione presente. Le mutazioni di BRCA1 aumentano notevolmente il rischio di sviluppare un carcinoma dell'ovaio, che si presenta nel 20-40% dei portatori. Mutazioni in BRCA2 conferiscono un rischio più basso di sviluppare un carcinoma dell'ovaio (10-20%) ma sono più frequentemente associate al carcinoma della mammella maschile. I portatori di mutazioni di BRCA1 e

BRCA2 sono maggiormente a rischio per altri carcinomi epiteliali, tra cui quelli del pancreas e della prostata (Jacobson M. et al., 2018).

Il carcinoma mammario ereditario è fortemente associato al carcinoma ovarico ereditario. Le mutazioni germinali nei geni BRCA1 e BRCA2 sono infatti responsabili della maggior parte dei casi di cancro ereditari di entrambi gli organi (Al Bakir M et al., 2014).

Le principali evidenze cliniche che caratterizzano il CM ereditario sono:

- età di insorgenza precoce;
- maggiore frequenza di neoplasie bilaterali;
- casi in famiglia di tumori della mammella maschili;
- associazione tra tumori al seno e all'ovaio.

Altri geni di suscettibilità conosciuti sono coinvolti con minore frequenza. Nel complesso, questo gruppo è responsabile di meno del 10% dei CM ereditari.

Mutazioni germinali di p53 e CHEK2 sono responsabili dell'8% dei CM correlati a geni singoli. Altri geni come PTEN, LKBI/STK11, ATM, BARD1 e PALB2 sono mutati in meno dell'1% dei casi.

Nei pazienti portatori di varianti in BRCA1, il rischio di sviluppare un CM fino all'età di 70 anni varia dal 65% all'80% e il tumore è frequentemente triplo negativo, ossia non esprime recettori ormonali nè mostra iperespressione dell'oncogene HER2/neu, mentre nel caso di mutazioni a carico del gene BRCA2 il rischio di CM è compreso tra il 45% e l'85% e i tumori sono spesso

positivi ai recettori degli estrogeni e del progesterone (ER, PR) (Juwle A. et al.,2012). Sebbene il nome dei due geni (BReast CAncer) possa suggerire un richiamo alla malattia, essi svolgono, invece, funzioni indispensabili che la cellula deve mantenere attivate per potersi proteggere dagli insulti ambientali, quindi dai meccanismi della carcinogenesi inclusi nel processo di trasformazione neoplastica. I geni BRCA 1/2 sono geni oncosoppressori (“manutentori”; “riparatori”), in quanto svolgono una funzione di controllo, che si esplica a monte nel coinvolgimento nei sistemi di riparazione del DNA, a valle nel controllo del ciclo cellulare, attraverso i vari checkpoints (Venkitaraman, 2002; Palma et al., 2006).

### ***1.1.3 Tipi di CM***

Le malattie che interessano la ghiandola mammaria possono essere meglio comprese considerando la sua anatomia normale. La mammella umana contiene da sei a dieci sistemi duttali principali. L’epitelio squamoso cheratinizzante della cute soprastante penetra negli orifizi del capezzolo e si trasforma bruscamente nell’epitelio cubico bistratificato che riveste i dotti. Le successive diramazioni dei grandi dotti conducono alla fine all’unità terminale duttulo-lobulare. Il dotto terminale si dirama in una serie di piccoli acini a grappolo per formare un lobulo.

La cellula da cui originano i CM è importante perché ha implicazioni notevoli per l'eziologia ed il trattamento. L'ipotesi delle "cellule staminali neoplastiche" suggerisce che le modificazioni maligne avvengano in una popolazione di cellule staminali con proprietà uniche che le distinguono dalle cellule più differenziate (Hahn WC et al.,2002; Hanahan D et al.,2000). Sebbene la maggior parte delle cellule tumorali costituisca progenie di cellule non staminali, solo le staminali maligne contribuirebbero alla progressione o alla recidiva tumorale.

Il tipo di cellula che più probabilmente è all'origine della maggior parte dei CM è la cellula luminale che esprime ER, poiché la maggioranza delle neoplasie è ER-positiva. Difatti il tipo più comune di CM è il carcinoma duttale, che inizia nelle cellule dei dotti. Il cancro che inizia nei lobi o lobuli si chiama carcinoma lobulare e spesso si trova in entrambi i seni.

Nonostante esista l'evidenza che tutti i CM originino dall'unità terminale duttulo-lobulare, persiste l'uso dei termini "lobulare" e "duttale" per descrivere i carcinomi sia in situ sia invasivi. Convenzionalmente, il termine "lobulare" si riferisce a un tipo specifico di carcinomi, mentre "duttale" è usato più genericamente per indicare adenocarcinomi che non abbiano un'ulteriore designazione.

Oltre il 95% dei CM è rappresentato da adenocarcinomi, che si suddividono in carcinomi in situ e carcinomi invasivi. Il carcinoma in situ consiste in una

proliferazione di cellule neoplastiche limitata ai dotti e ai lobuli dalla membrana basale. Il carcinoma invasivo penetra nella membrana basale invadendo lo stroma.

Il carcinoma duttale in situ (DCIS) è il tipo più comune di CM in situ. È considerato una forma non invasiva perché le cellule anomale non si diffondono oltre il sito dal quale hanno avuto origine. Tuttavia, senza il trattamento, le donne affette da DCIS piccoli di basso grado sviluppano un carcinoma invasivo con un'incidenza annua dell'1% circa (Page DL, et al., 1995).

Il carcinoma lobulare in situ (LCIS) è molto meno frequente del carcinoma duttale in situ ma è più comune nelle giovani donne, e l'80-90% dei casi compare prima della menopausa.

#### ***1.1.4 CM invasivi***

Il carcinoma invasivo non altrimenti specificabile (NAS) comprende la maggior parte dei carcinomi (70-80%). Le nuove tecniche che analizzano il DNA, l'RNA e le proteine dei carcinomi hanno fornito un quadro globale per le nuove classificazioni molecolari di questo gruppo di CM. I profili di espressione genica, che sono in grado di misurare le quantità relative di mRNA per ogni singolo gene, hanno identificato cinque modelli principali di espressione genica nel gruppo NAS: luminale A, luminale B, normale, simil-

basale e HER2 positivo (Gatti V. et al.,2019). Queste classi molecolari hanno assunto importanza clinica in quanto permettono di definire piani terapeutici mirati ed effettuare correlazioni con la prognosi.

Luminale A (HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>): rappresenta la maggior parte (74%) dei CM (dal 40 al 55% dei carcinomi NAS). È il gruppo più grande ed è costituito dai carcinomi che esprimono ER<sup>+</sup> e/o PR<sup>+</sup> ma non HER2. La maggior parte è ben differenziata o moderatamente differenziata e si presenta perlopiù nelle donne dopo la menopausa. In genere questi tumori crescono lentamente e sono associati alla prognosi più favorevole, soprattutto nel breve termine, in quanto l'espressione dei recettori ormonali è predittiva di una risposta favorevole alla terapia ormonale (Blows et al., 2010; Anderson et al., 2014).

Luminale B (HR<sup>+</sup>/HER2<sup>+</sup>): questo gruppo di carcinomi (dal 15 al 20% dei carcinomi NAS) esprime ER ma in genere è di grado superiore. Ha un tasso proliferativo più alto e spesso overesprime HER2/neu. Talvolta vengono chiamati carcinomi “triplici positivi” (ER<sup>+</sup> e/o PR<sup>+</sup> e HER2<sup>+</sup>). Questi tumori tendono ad essere più aggressivi dei tumori del gruppo luminale A (Parise et al., 2014).

HER2 positivo (HR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup>): questo gruppo (dal 7 al 12% dei carcinomi NAS) comprende i carcinomi ER-negativi che iperesprimono la proteina HER2/neu. Queste neoplasie sono in genere scarsamente differenziate, hanno un tasso di proliferazione elevato e sono associate ad un'alta frequenza di metastasi

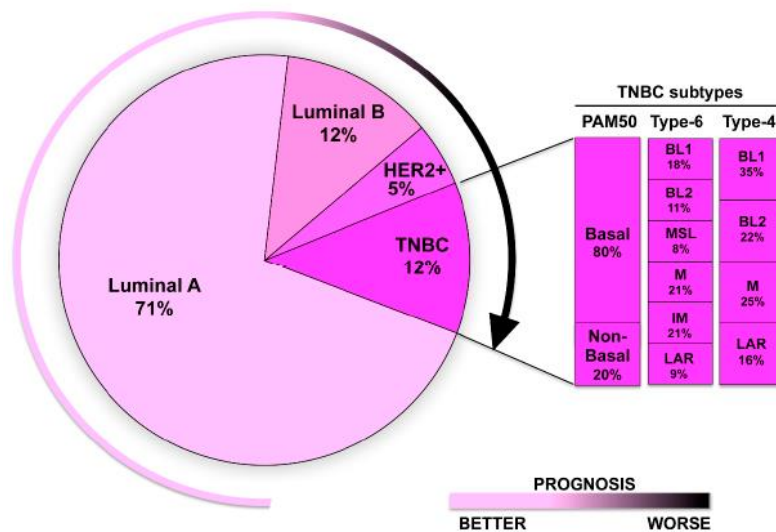


cerebrali (Blows et al., 2010). Tuttavia, la recente diffusione di terapie mirate per HER2 ha invertito la maggior parte delle prognosi negative di tumori caratterizzati da iperespressione di HER2.

Simil-basale: questi carcinomi (dal 13 al 25% dei carcinomi NAS) si caratterizzano per l'assenza di ER, PR e HER2/neu e vengono quindi definiti tripli negativi (Triple-Negative Breast Cancer-TNBC) (Gatti V. et al.,2019).

Sono più comuni nelle donne in pre-menopausa come anche nei portatori di mutazioni in BRCA1 (Perou et al., 2011). Mostrano prognosi peggiore a breve termine rispetto ad altri tipi di CM perché non esistono attualmente terapie mirate (Blows et al., 2010; Adrada et al., 2014).

Vengono distinti in sei sottotipi: Basal-Like 1(BL1), Basal-Like 2 (BL2), immunomodulatorio (IM), mesenchimale (M), mesenchimale staminale-like (MSL) e luminale con recettore degli androgeni (LAR) (Lehmann et al.,2011).



**Fig.1:** Modello schematico dell'eterogeneità del tumore mammario triplo negativo con le relative percentuali di ogni sottotipo ed annessa prognosi (Gatti V. et al.,2019).

## **1.2 Il gene p63 e i suoi prodotti**

### ***1.2.1 La famiglia p53: struttura e funzione***

La proteina TP53 o Tumor Suppressor Protein 53, dal suo peso molecolare, è un fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare e ricopre la funzione di soppressore tumorale, la cui mutazione risulta frequentemente associata ai tumori umani (Melino et al., 2011; J.Bergholz et al.,2012).

In seguito a danni a carico del DNA o altri stress cellulari, come lo stress ossidativo, condizioni di ipossia o in seguito ad esposizione a sostanze cancerogene, i livelli di p53 si accumulano e si attivano. L'attivazione di p53 dirige una varietà di risposte cellulari, tra cui il ripristino dell'omeostasi metabolica, l'innescamento delle difese antiossidanti, la riparazione del DNA, l'arresto del ciclo cellulare, l'induzione della senescenza e dell'apoptosi cellulare, a seconda della gravità del danno. La specifica risposta innescata dipende dalla possibilità o meno che il danno venga riparato. Nel caso in cui il danno non sia riparabile, la cellula va incontro a morte per mantenere l'omeostasi dei tessuti (J.Bergholz et al.,2012;Levine AJ et al., 2009).

Verso la fine degli anni '90 vennero scoperti due membri della famiglia di p53, chiamati p63 e p73 (Yang A et al.,1998). Essi sono fattori di trascrizione strettamente correlati che condividono sequenze altamente omologhe. In quanto fattori di trascrizione, essi si legano direttamente al DNA, in forma tetramericata e, interagendo con altri fattori di trascrizione e con l'apparato

trascrizionale, controllano l'espressione di migliaia di geni coinvolti in tutti gli aspetti della vita cellulare. La proteina p53 intera contiene cinque domini distinti, ossia due domini di transattivazione N-terminali (TAD-I e TAD-II), un dominio ricco in prolina (PRD), un dominio di legame al DNA (DBD), un dominio di oligomerizzazione (OD) ed infine un dominio regolatorio C-terminale che contiene un segnale di localizzazione nucleare (May P.,1999). Come nel caso di p53, il gene p63 codifica per un dominio di transattivazione N-terminale, un dominio centrale di legame al DNA ed un dominio di oligomerizzazione C-terminale. Nonostante tale similarità, esistono differenze significative tra i due omologhi. Difatti lo studio del ruolo svolto da p63 viene a volte reso più problematico dalla variabilità strutturale dei prodotti proteici provenienti dal gene. Difatti, analogamente a p73, il gene p63 è trascritto in più isoforme. Mentre p53 possiede un solo promotore, il gene p63 contiene due siti di inizio della trascrizione che codificano per proteine che contengono o meno il dominio di transattivazione N-terminale. Le proteine che contengono tale dominio vengono definite con il termine di isoforma TAp63, nel caso contrario l'isoforma viene definita  $\Delta$ Np63 ed è trascritta a partire dal secondo promotore alternativo localizzato nel terzo introne del gene. In questa isoforma l'esone 4, denominato esone 3', codifica per la porzione N-terminale ed è assente nell'isoforma TAp63 in seguito al processo di splicing (Bergholz et al.,2012). È stato dimostrato che gli unici 14 amminoacidi N-terminali dell'isoforma

$\Delta Np63$  posseggano attività transattivante (Ghioni P. et al.,2002), facendo sì che tale isoforma possa comunque essere considerata un fattore di trascrizione a tutti gli effetti. Inoltre, in seguito ad eventi di splicing alternativo, vengono generate proteine con diverse porzioni C-terminali. Ad esempio, sei varianti possono essere generate a partire dai due diversi promotori di p63 con tre diverse estremità C-terminali definite  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Yang A et al.,1998). Le isoforme  $\alpha$  di p63, sia TAp63 $\alpha$  che  $\Delta Np63\alpha$ , contengono inoltre due regioni aggiuntive assenti in p53, conosciute come dominio sterile  $\alpha$  movente o dominio SAM e il dominio Post-Inibitorio (PID). Il dominio SAM consiste di 5  $\alpha$ -eliche strettamente associate tra loro e risulta essere importante per l'interazione proteina-proteina, probabilmente con altre proteine contenenti domini SAM (Westfall et al., 2004; Melino et al., 2011).

Il dominio SAM può essere coinvolto anche in altri processi come l'apoptosi, l'attivazione trascrizionale, il rimodellamento della cromatina come anche nel signaling dei recettori tirosin-chinasici (Chakrabarti et al.,1999), a testimonianza di come questo dominio possa fornire grande plasticità alla proteina p63 $\alpha$ .

Il dominio PID lega il dominio TA delle isoforme TAp63, inibendo la transattivazione genica e regolandone l'attività.

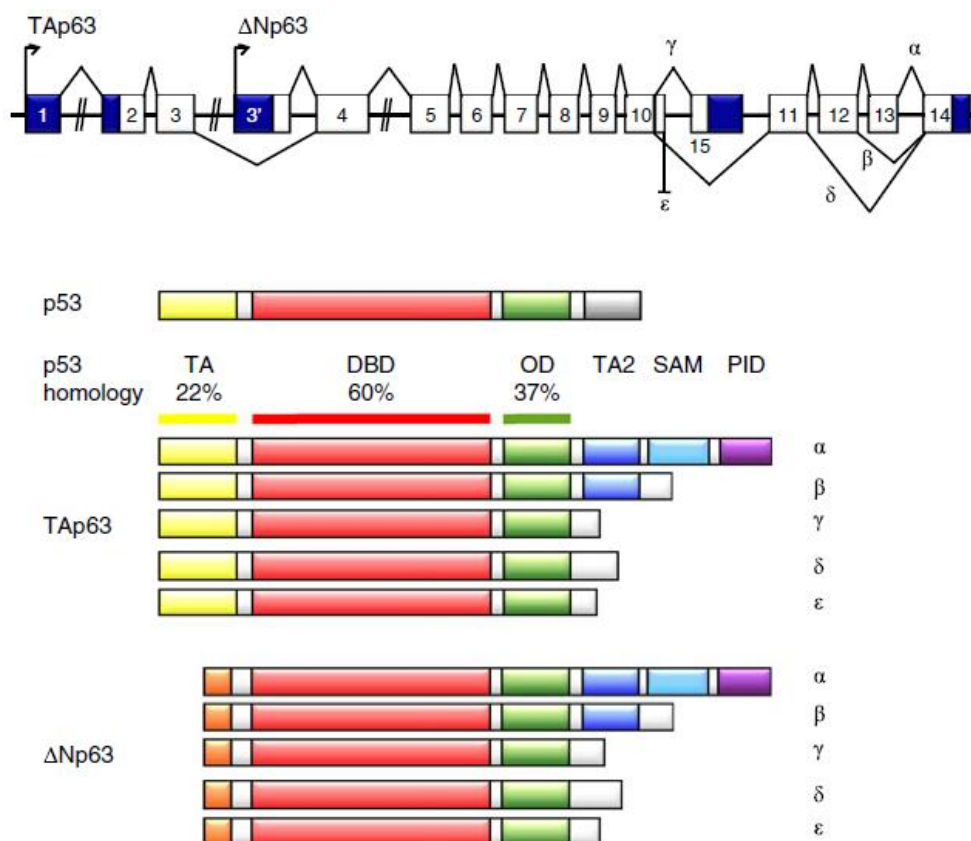
Le isoforme TAp63 $\alpha$  e TAp63 $\beta$  contengono un dominio TA addizionale (TA2) codificato dagli esoni 11 e 12 del gene che potrebbe essere responsabile della mediazione dell'attività e della stabilità delle isoforme (Ghioni P. et al.,2002).

Il dominio TA di p63 presenta un'omologia del 22% con il dominio corrispondente in p53. I domini DBD ed OD di p63 sono condivisi da tutte le isoforme e risultano omologhi a quelli presenti in p53 rispettivamente per il 60% e il 37% (Yang A. et al.,1999).

D'altra parte il dominio OD di p63 è omologo al corrispondente dominio della proteina p73 con una percentuale del 60% (Westfall et al., 2004).

È stato dimostrato che p63 e p73 interagiscono tra di loro ma non con p53 (Rocco JW et al.,2006), probabilmente a seguito delle differenze nel dominio OD, mentre p63 e p73 tendono a formare preferenzialmente eterotetrameri di omodimeri (Joerger A. et al.,2009).

La presenza o l'assenza di differenti domini nelle isoforme di p63 influenza non solo la loro capacità di transattivazione, ma anche la loro stabilità. TAp63 $\gamma$  ha il maggiore potenziale di transattivazione su promotori responsivi anche alla proteina p53, data la presenza del dominio TA e l'assenza del dominio PID. In ogni caso le isoforme TAp63 mostrano emivita molto più breve rispetto alle isoforme  $\Delta$ Np63 e vengono rapidamente degradate quando espresse in maniera esogena (Bergholz J. Et al.,2012).



**Fig.2:** Struttura delle isoforme di p63 con i relativi domini e percentuali di omologia con i domini comuni a p53 (Bergholz et al.,2012).

Sulla base di tali evidenze, si è pensato che questi geni avessero funzioni ridondanti. Sin dal principio è stato chiaro come sia p63 che p73 siano coinvolti in un vasto spettro di attività biologiche che includono la proliferazione cellulare, l'apoptosi, lo sviluppo e il differenziamento cellulare, la senescenza e l'invecchiamento. Nello specifico, per quanto riguarda p63 nella biologia del cancro, il suo ruolo è tutt'ora poco chiaro, ma risulta coinvolta in tutti gli aspetti della carcinogenesi e della progressione del cancro (Melino G.,2011). Ricopre inoltre un ruolo critico nello sviluppo embrionale, nel mantenimento delle cellule staminali epiteliali e nel differenziamento dei tessuti epiteliali.

Mutazioni germinali in eterozigosi nel gene codificante la proteina p63 risultano fortemente associate con patologie autosomiche dominanti dello sviluppo umano. Mutazioni del dominio DBD di p63 sono correlate con la sindrome da ectrodattilia-displasia ectodermica-schisi labiopalatina (anche chiamata sindrome EEC). Mutazioni a carico del dominio SAM delle isoforme p63 $\alpha$  risultano invece associate con la sindrome da anchiloblefaron–anomalie ectodermiche–schisi labiopalatina (anche chiamata sindrome AEC o di Hay-Wells) definita dalla caratteristica mancata separazione dei margini delle palpebre in aggiunta alle anomalie della pelle, dei denti, delle unghie e dei capelli (anomalie ectodermiche). Mutazioni frameshift a carico di queste stesse isoforme provocano la mancanza del dominio PID e/o del dominio SAM a causa della produzione di un'estremità C-terminale troncata e risultano responsabili della Sindrome da anomalie mammarie e degli arti nella quale si riscontrano ipoplasia mammaria, ectrodattilia e palatoschisi con assenza tuttavia di difetti epidermici. Una mutazione puntiforme (R298Q) nel dominio DBD di p63 risulta associata alla sindrome ADULT (Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth), caratterizzata da ectrodattilia, eccesso di efelidi, onicodisplasia, ostruzione dei dotti lacrimali e ipodonzia e/o perdita precoce dei denti permanenti (Bergholz J. Et al.,2012).

La perdita in omozigosi di p63 nel topo causa un'elevata mortalità perinatale dovuta alla totale mancanza di tutti gli epiteli stratificati e dei tessuti di

derivazione ectodermica come peli, ghiandole mammarie e denti, unitamente a difetti craniofacciali severi ed anomalie a carico degli arti (Yang A. et al.,1999). L'espressione esogena dell'isoforma  $\Delta Np63\alpha$  in questo tipo di sistema ripristina in parte i difetti proliferativi dell'epidermide mancante della proteina p63 mentre la reintroduzione dell'isoforma TAp63 $\alpha$  non ha mostrato significativi effetti sullo sviluppo della pelle (Candi E. et al.,2006). A dimostrazione di ciò, topi knock-out per l'isoforma TAp63 sviluppano epiteli stratificati completamente differenziati, dimostrando che tale isoforma sia probabilmente superflua per lo sviluppo dell'epidermide (Su X et al.,2009).

P63 è inoltre coinvolta nella senescenza cellulare e nell'invecchiamento, in particolare l'assenza dell'isoforma TAp63 nei precursori cellulari del derma provoca un aumento del tasso proliferativo, instabilità genomica e danno a carico del DNA. Queste osservazioni indicano che TAp63 rappresenta un freno alla proliferazione cellulare dei precursori cutanei e che la sua carenza provoca la senescenza innescata da un aumento del danno al DNA. Di conseguenza, topi knock-out per l'isoforma TAp63 invecchiano precocemente, come dimostra l'aumento della curvatura della colonna vertebrale e la diminuzione della durata della vita (Su X et al.,2009).

Durante la vita adulta umana, le isoforme  $\Delta Np63$ , in particolare  $\Delta Np63\alpha$ , sono espresse abbondantemente nelle cellule basali epiteliali, come lo strato basale della pelle, le cellule mioepiteliali della mammella, le cellule basali della



prostata e nelle cellule epiteliali del timo. Durante lo sviluppo del topo, il trascritto dell'isoforma  $\Delta Np63\alpha$  viene rilevato nell'ectoderma embrionale, in uno stadio dello sviluppo embrionale precedente alla fase di stratificazione e successivamente viene espresso nello strato basale e non negli strati superficiali. D'altra parte, le isoforme TAp63 sono espresse a livelli significativi solo nella linea germinale femminile dove risultano necessarie per la protezione dallo stress genotossico durante la meiosi. (Bergholz J. Et al., 2012; Westfall et al., 2004).

Sebbene non esistano ancora evidenze definitive circa il ruolo specifico di ciascuna delle isoforme, numerosi dati supportano il coinvolgimento delle isoforme TAp63 nell'innescamento dell'apoptosi e della senescenza, mentre le isoforme  $\Delta Np63$  risultano associate alla promozione della proliferazione e sopravvivenza cellulare. Entrambe risultano tuttavia descritte come inibitori del processo metastatico sebbene attraverso meccanismi differenti.

### ***1.2.2 Ruolo di p63 come fattore di trascrizione***

A causa delle numerose isoforme che possono essere generate dal gene p63, molti studi si sono concentrati sulla determinazione delle vie di regolazione mediate dalle proteine codificate dalle diverse varianti di p63, in termini di attivazione o repressione della trascrizione di geni. Poiché il grado più significativo di omologia tra p53 e p63 si ha nel dominio di legame del DNA e nei residui critici per il corretto ripiegamento dell'intero dominio, nonché nella

sequenza dedita al legame al DNA bersaglio, che si presentano completamente conservati (Yang et al., 1998; Celli et al., 1999), gli studi iniziali sono stati condotti per determinare se p63 potesse regolare geni regolati a loro volta da p53.

Saggi di trasfezione transiente hanno dimostrato che p63 attiva o reprime la trascrizione di geni reporter localizzati a valle di siti di legame al DNA di p53. Come predetto dalla sua struttura, la variante TAp63 può transattivare geni bersaglio di p53, mentre la variante  $\Delta$ Np63 si ritiene agisca come un dominante negativo. L'attivazione trascrizionale da parte delle varianti TA è più probabilmente dovuta ad interazioni del dominio di transattivazione con proteine co-attivatrici, mentre gli effetti inibitori di  $\Delta$ Np63 $\gamma$  e  $\Delta$ Np63 $\alpha$  sono probabilmente attribuibili alla loro dimostrata affinità per p53, con conseguente concorrenza diretta per i target di p53. Questo meccanismo di inibizione competitiva è sottolineato dal modo dose-dipendente in cui le isoforme  $\Delta$ N sopprimono l'attività di p53 (Yang et al., 1998). Alla competizione si aggiunge inoltre l'effetto inibitorio del dominio PID di  $\Delta$ Np63 $\alpha$  dovuto all'interazione con il dominio TA di p63, in una regione omologa al sito di legame della MDM2 per p53 (principale inibitore di p53), per prevenire il legame di proteine co-attivatrici (Westfall et al., 2003; Ghioni et al., 2002; Serber et al., 2002).

A supporto di questa tesi, studi di confronto delle attività delle varianti TA di p63 mostrano che la variante TAp63 $\gamma$  stimola la trascrizione così come la forma

wild-type (WT) di p53, mentre TAp63 $\alpha$  mostra poca o nessuna attività transattivante (Yang et al., 1998). Al contrario,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  reprime la trascrizione p53- o TAp63 $\gamma$ -mediata, mentre  $\Delta$ Np63 $\gamma$  è solo in grado di reprimere la trascrizione p53-mediata (Yang et al., 1998).

In aggiunta alle evidenze circa la regolazione da parte di p63 dei geni bersaglio di p53, la valutazione degli aspetti biochimici del diretto legame al DNA risulta necessaria per confermare il ruolo di p63 come fattore di trascrizione. In saggi in vitro di DNA-binding utilizzando sequenze di siti noti per il legame di p53 al promotore di p21<sup>Waf2 / Cip1</sup> dimostrano che  $\Delta$ Np63 $\alpha$  lega gli elementi responsivi a p53 nel promotore. Tale legame è stato inoltre confermato con esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) in cheratinociti primari umani derivanti dall'epidermide (Westafall et al., 2003). Tali risultati dimostrano che p63 si lega agli stessi geni di p53 e suggeriscono che p63, a seconda della variante, può regolare positivamente o negativamente geni bersaglio di p53 coinvolti nella regolazione della crescita. Esperimenti ChIP aggiuntivi con fibroblasti embrionali di topo E1A rivelano il legame di p63 a geni bersaglio di p53, indicando il possibile coinvolgimento di p63 nella regolazione della stabilità di p53 e delle sue funzioni apoptotiche (Flores et al., 2002).

### ***1.2.3 Ruolo di p63 nei tumori***

Sebbene p63 sia omologo di p53 e p73, entrambi noti per essere oncosoppressori, esso risulta raramente mutato nei tumori (Yang A. et al.,1998; Osada et al., 1998). Perciò il link tra p63 e carcinogenesi rimane poco chiaro dal momento in cui è stato inoltre riportato che p63 risulta frequentemente amplificato in linee cellulari primarie derivate da carcinomi a cellule squamose (SCC). In particolare, livelli incrementati dell'isoforma  $\Delta Np63\alpha$  sono stati riscontrati nell'85-100% dei casi di SCC, inclusi SCC testa/collo, dell'esofago, del polmone, della cervice come anche nei carcinomi basali della mammella. Questi risultati suggeriscono che p63 possa fungere da oncogene, la cui amplificazione può condurre all'insorgenza di SCC, probabilmente in combinazione con disfunzioni a carico di p53 (Massion PP et al.,2003). Sebbene si sia quindi ipotizzato che il livello di espressione di p63 rappresenti un fattore scatenante lo sviluppo dei tumori SCC, fin tanto che non saranno elucidati i geni target regolati dal p63, non è del tutto possibile determinare se l'overespressione di p63 riscontrata sia causativa dello sviluppo tumorale o ne rappresenti una conseguenza (Westfall et al.,2004). Tuttavia, esperimenti condotti in modelli murini hanno rivelato che la perdita di un allele di p63 aumenti la predisposizione al cancro e peggiori il fenotipo tumorale laddove si abbia in concomitanza la perdita di p53 o p73 in eterozigosi. Ad esempio, confrontando topi  $p53^{+/-}$  con topi ( $p53^{+/-}$ ,  $p63^{+/-}$ ), questi ultimi sviluppano

spontaneamente SCC con una frequenza sorprendentemente elevata. D'altra parte, topi ( $p73^{+/-}$ ,  $p63^{+/-}$ ) mostrano una maggiore predisposizione all'insorgenza di adenocarcinoma mammario, SCC, osteosarcomi ed adenomi salivari. Tali studi hanno inoltre dimostrato come i tumori  $p63^{+/-}$  nel topo vadano incontro a Loss of Heterozigosity (LOH) con la perdita del secondo allele, caratteristica tipica dell'inattivazione genica dei geni oncosoppressori. Inoltre i tumori che si sviluppano in topi ( $p53^{+/-}$ ,  $p63^{+/-}$ ) mostrano un fenotipo molto più aggressivo, con una frequenza di metastasi del 50% rispetto a quella osservata nei topi  $p53^{+/-}$  che risulta pari al 5% (Flores ER et al.,2005). Sembra che entrambe le isoforme, TAp63 e  $\Delta Np63$ , siano coinvolte nell'inibizione del processo metastatico, in quanto topi knock-out per una delle due isoforme sviluppano tumori spontanei che risultano altamente metastatici (Su X et al.,2010).

È stato inoltre ipotizzato che il rapporto tra le due principali classi di isoforme, così come la loro interazione con gli altri membri della famiglia di p53, giochi un ruolo importante nella formazione del cancro e nella sua progressione.

I patterns di espressione in tessuti tumorali hanno dimostrato come le isoforme TA risultino non espresse o siano solo debolmente espresse, mentre le isoforme  $\Delta N$  sono rappresentate a livelli molto più elevati (Osada et al., 1998; Chen et al., 1999). La differente espressione delle due isoforme osservate nel cancro risulta quindi coerente con l'ipotesi che TAp63 possa funzionare come

soppressore del tumore, mentre  $\Delta Np63\alpha$  possa agire come un oncogene (Schultz et al., 1997; Y. Chen et al., 2017).

Diversi studi hanno fatto luce sul potenziale oncogenico di  $\Delta Np63\alpha$ . Esperimenti di overespressione di  $\Delta Np63\alpha$  in cellule Rat-1 mostrano aumentati livelli di crescita delle colonie in soft-agar, supportando l'ipotesi che  $\Delta Np63\alpha$  agisca come oncogene (Hibi et al., 2000).

In esperimenti sia in vitro che in vivo è stato rilevato che d'altra parte TAp63 ricopre il ruolo di soppressore tumorale dal momento che la sua carenza promuove la proliferazione e la carcinogenesi (in concomitanza con insufficienza di p53), mentre la sua espressione esogena può indurre senescenza in colture cellulari ed inibire la formazione del tumore in topi trapiantati (Guo X et al., 2009).

#### ***1.2.3.1 Ruolo di p63 nel CM***

P63 è normalmente espresso nei nuclei delle cellule mioepiteliali basali che circondano le cellule ghiandolari. Molti riportano che in queste cellule l'isoforma maggiormente espressa è  $\Delta Np63$  (Barbareschi et al., 2001; Leong et al., 2007), mentre l'isoforma TA è espressa nelle cellule della parete ma assente nelle cellule epiteliali e basali (Nylander et al., 2000). Mutazioni a carico del gene p63 non sono state descritte nei CM (Ribeiro-Silva et al., 2003) ma, in alcuni casi, il gene p63 sembra presentare un'alterazione nella sua espressione che generalmente è una caratteristica di tumori meno differenziati e più

aggressivi. Infatti, p63 è risultato essere sovra-espresso nei carcinomi basal-like scarsamente differenziati, carcinomi sarcomatoidi/metaplastici (Stefanou et al., 2004), carcinomi adeno-cistici (Leong et al., 2007), carcinomi epiteliali-mioepiteliali, adeno-mioepiteliali maligni (Di Renzo et al., 2002). A sostegno dell'ipotesi che p63 possa essere un marker di tumori scarsamente differenziati e/o di tipo basale, diversi studi hanno dimostrato che tumori ben differenziati quali carcinomi luminali, carcinomi intra-duttali, carcinomi duttali “low grade”, carcinomi midollari e tubulari risultino tutti costantemente p63-negativi (Barbareschi et al., 2001). Non vi sono al momento molti studi che riportano queste differenze di espressione tra le due isoforme di p63. Tuttavia uno studio molto recente evidenzia, attraverso l'immunoistochimica, come il 17% dei CM basal-like tripli negativi presentino l'isoforma  $\Delta Np63$  nei nuclei delle cellule tumorali in confronto al 7,3% che sono invece risultati positivi per l'isoforma TAp63 (Coates P. et al., 2018). Uno studio ha infatti dimostrato come p63 sia essenziale per il mantenimento della staminalità e la rigenerazione di sferoidi di cellule tumorali staminali derivate da un modello murino di CM (Zucchia et al., 2008). Tale isoforma, sebbene sia stata prevalentemente connessa con il mantenimento della staminalità delle cellule di mammella durante le fasi precoci di carcinogenesi (Di Renzo et al., 2002), è risultata avere un effetto importante anche sull'induzione della perdita di adesione cellulare, aspetto chiave nei processi di metastatizzazione ed invasione tumorale. Tale processo

risulta tuttavia proprio dei sottotipi epiteliali e non mesenchimali di carcinomi tripli negativi basal-like, suggerendo un comportamento dell'isoforma  $\Delta Np63$  dipendente dal tipo cellulare (Nekulova et al., 2016). La sovra-espressione di p63 in questi tumori sembra inoltre correlare con caratteristiche prognostiche peggiori (Gracia et al., 2007). Infatti, la sovra-espressione caratterizza tumori dello stadio III e IV ed aumenta in maniera direttamente proporzionale con volume tumorale dei carcinomi (Ribeiro-Silva et al., 2003) e si associa ad un aumento del pleomorfismo nucleare (Thike et al., 2010). Allo stesso tempo è possibile, seppur raro, trovare tumori ben differenziati in cui p63 è espresso, ed in genere questi vengono associati ad una buona prognosi. In questi studi tuttavia, non è stata mai effettuata una correlazione con un'isoforma specifica di p63, pertanto si può pensare che la diversa prognosi potrebbe essere legata ad una delle due isoforme.



### **1.3 Le Cancer Stem Cells (CSC)**

Evidenze crescenti dimostrano come i tumori contengano sotto-popolazioni di cellule con proprietà simili alle cellule staminali. Tali cellule sono ormai comunemente chiamate Cellule Staminali Tumorali o CSCs (Cancer Stem Cells). Si ritiene che le CSCs, in virtù della loro aumentata resistenza al trattamento chemioterapico e più in generale alle convenzionali terapie anti-tumorali, siano le principali responsabili di recidiva e metastasi. Individuare trattamenti specificamente diretti contro CSCs è diventato un imperativo, e la conoscenza dei processi molecolari che regolano le proprietà carcinogeniche, un'irrinunciabile priorità della ricerca biomedica.

#### ***1.3.1 Definizione di staminalità***

La cellula staminale viene attualmente definita in base a due caratteristiche fondamentali: l'auto-rinnovamento e la pluripotenza. La cellula staminale può infatti andare incontro a due tipi di divisione cellulare: una simmetrica, generando cellule figlie identiche a sé stessa, ed una asimmetrica, generando una copia di sé e una cellula più differenziata. Ne consegue che alcune cellule figlie mantengono la capacità di auto-rinnovamento ed assicurano la propagazione a lungo termine della popolazione staminale, mentre altre avviano un processo di differenziamento che origina vari tipi cellulari (pluripotenza).

### ***1.3.2 La teoria delle CSCs***

Applicando la definizione di cellula staminale all'ambito tumorale, la teoria delle CSCs consta di due componenti inseparabili e correlate: da una parte vi è l'assunto che nel tumore sia possibile individuare popolazioni di cellule che mantengono o riacquistano la capacità di auto rinnovarsi (Fig.4); dall'altra l'evidenza per la quale la massa tumorale non abbia caratteristiche di omogeneità e sia quindi costituita da diversi tipi cellulari organizzati in modo gerarchico, con le CSCs che iniziano, guidano e sostengono il processo maligno, auto-rinnovandosi e generando tutte le popolazioni di cellule della massa eterogenea (Dontu et al. 2003; Wright et al., 2008; Charafe-Jauffret et al., 2009).

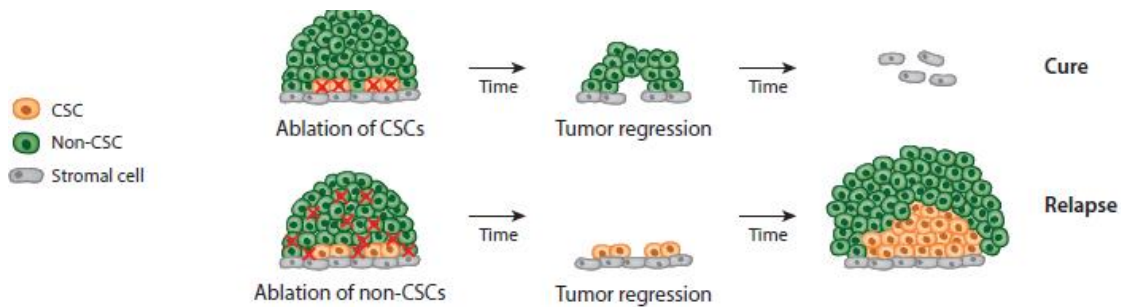
In sostanza, il tumore si può vedere come un organo anomalo, con una componente di cellule staminali che sostiene la crescita della massa e genera tutti i tipi cellulari che la compongono.

L'ipotesi delle CSCs è stata convalidata per la prima volta da Bonnet e collaboratori che hanno dimostrato che solo una piccola sotto-popolazione di cellule leucemiche CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, fenotipicamente simili alle cellule staminali ematopoietiche, erano in grado di formare il tumore se inoculate in un topo NOD/SCID (non-obese diabetic, severe combined immunodeficient) (Bonnet et al., 1997).

Era presente già dagli anni 80, l'evidenza che solo una piccola percentuale di cellule isolate da tumori solidi fosse in grado di originare colonie *in vitro* e che fosse necessario inoculare un alto numero di cellule tumorali per generare tumori in vivo (Heppner, 1984). Si faceva strada l'ipotesi che solo una sottopopolazione di cellule tumorali, fenotipicamente distinte dalle altre, avesse capacità carcinogenica, definendo l'identità della CSC come quella cellula, isolata dal tumore primario, in grado di riformare un tumore analogo in eterotrapianto.

Negli anni, popolazioni cellulari che soddisfano tale criterio sono state isolate da vari tipi di tumori (Singh et al., 2004; Chan et.al, 2009; Prince et al., 2007; Hermann et al., 2007; Yang et al., 2008).

Considerando il tumore come una massa eterogenea costituita da varie popolazioni cellulari con diversi stadi di differenziamento, bisogna considerare che tali popolazioni posseggano diverso potenziale proliferativo e metastatico e diversa sensibilità alle terapie. Si ritiene che l'accrescimento in volume del tumore sia sostenuto da cellule già differenziate ma con alto potenziale proliferativo, mentre le CSCs, meno proliferative ma multipotenti e autorigeneranti, potrebbero essere una frazione minima del tumore. La maggior parte dei farmaci attualmente in circolazione, pur efficaci nel ridurre il volume potrebbero non colpire la popolazione delle CSCs che sarebbe quindi in grado di rigenerare la formazione maligna, *in situ* o altrove (Fig. 3).



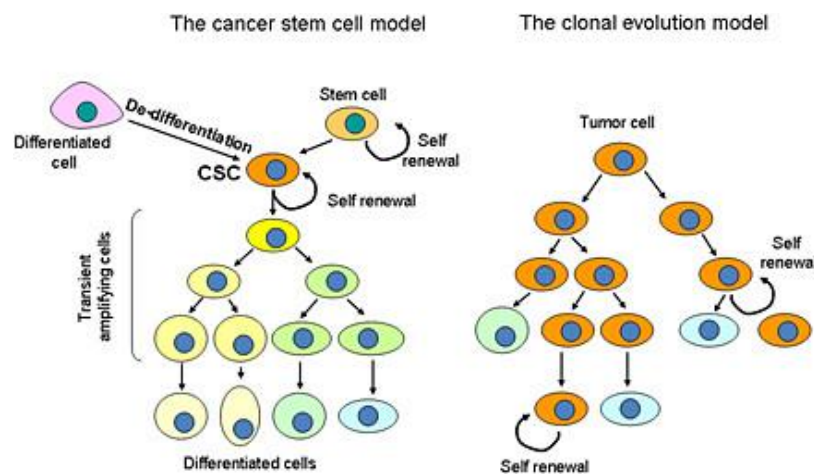
**Fig.3:** Meccanismo di resistenza delle CSCs ai trattamenti (Nassar D et al.,2016)

Molti modelli teorici suggeriscono che l'eliminazione delle CSCs possa comportare l'incapacità del tumore primario di riformarsi e delle metastasi di rinnovarsi, pertanto l'eliminazione del tumore stesso. Per quanto detto, trovare una terapia o un approccio che si risolva nella distruzione di queste cellule è fondamentale.

Tuttavia il modello si complica ulteriormente quando ci si interroga circa l'origine delle CSCs. Considerate le somiglianze con le normali cellule staminali che fisiologicamente riforniscono i tessuti dell'adulto delle popolazioni cellulari di cui necessita, si è ipotizzato che le CSCs derivassero da cellule staminali dei tessuti adulti trasformate. Esistono tuttavia degli studi, condotti proprio su CM, che suggeriscono l'ipotesi per la quale le CSCs si generino spontaneamente da cellule epiteliali trasformate (Chaffer et al., 2011), e che addirittura esista un equilibrio dinamico fra le varie popolazioni di cellule della massa tumorale, in cui cellule più differenziate siano in grado di de-

differenziare a CSCs in seguito a mutazione. (Meyer et al., 2009; Gupta et al., 2011).

Restano tuttavia accesi numerosi dibattiti circa l'attendibilità della teoria delle CSCs. Una visione contrapposta viene fornita dal modello di evoluzione clonale che spiega l'eterogeneità del tumore come una conseguenza del susseguirsi di mutazioni casuali che conducono alla selezione clonale in termini di diversità tumorale e carcinogenesi. Nel modello dell'evoluzione clonale, le cellule tumorali sono organizzate stocasticamente e qualsiasi cellula cancerosa può auto-rinnovarsi e dare origine ad una grande numero di discendenti una volta che acquisisce mutazioni e vantaggi selettivi (Yang F. et al.,2016).



**Fig. 4:** Schema riassuntivo dei processi di divisione ipotizzati, responsabili dell'eterogeneità tumorale caratterizzata dalla compresenza di cellule differenziate e CSCs (Carnero et al.,2015).

In effetti, nessuna di queste due teorie da sola è sufficiente a spiegare l'eterogeneità del tumore, perché l'ipotesi delle CSCs ignora l'eterogeneità genetica intra-tumorale, mentre il modello di evoluzione clonale risulta poco

esaustivo nello spiegare la diversità funzionale degli stati cellulari. È quindi ammissibile che la teoria delle CSC e il modello di evoluzione clonale non si escludano a vicenda. È stata quindi proposta e largamente accettata una nuova prospettiva che vede le CSCs come cellule che possano evolversi ed acquisire mutazioni durante la progressione del tumore e che il crescente carico mutazionale causi la compromissione dei programmi di maturazione, migliori le capacità di auto-rinnovamento e potenzi le proprietà delle CSCs (Melino et al., 2015).

La promessa allettante di nuovi bersagli terapeutici ha spinto i ricercatori a concentrare gli sforzi sulla caratterizzazione dei marcatori molecolari con cui individuare, isolare e studiare le CSCs di vari tipi di tumori.

Così, al CD133, per tumori cerebrali (Singh et al., 2004) e tumore del colon (O'Brien et al., 2007), si sono aggiunti il CD44 e il CD24 per i CM (Al-Hajj et al., 2003). È molto interessante osservare come questi marcatori siano stati identificati anche su cellule staminali non tumorali, ad ulteriore riprova del fatto che ci sono notevoli similarità tra cellule staminali normali e CSCs (You et al., 2004; Louis et al., 2007; Fan et al., 2008). Quindi le CSCs hanno molte proprietà delle cellule staminali normali ma inoltre possiedono la capacità di resistere ai farmaci e alle tossine attraverso l'espressione di trasportatori specifici (ATP-binding cassette o ABC) (Dean et al., 2005), riparare il DNA grazie all'espressione di specifiche proteine come MGMT (O-6-

methylguanine-DNA methyltransferase) ed infine hanno una maggiore capacità di resistenza all'apoptosi. Le CSCs inoltre possono "mimare" altri tipi cellulari e possono adattarsi più facilmente a cambiamenti micro ambientali. Un esempio di questa plasticità si nota a livello del microcircolo, dove le cellule tumorali esprimono geni associati alle cellule endoteliali, e conseguentemente danno il via alla neovascolarizzazione.

### ***1.3.3 CSCs e carcinoma mammario***

Nella ghiandola mammaria a riposo, le cellule staminali risiedono in nicchie quiescenti e subiscono una divisione asimmetrica durante la pubertà, la gravidanza e l'allattamento in risposta agli ormoni circolanti. Pertanto, la caratteristica dinamicità nello sviluppo della ghiandola mammaria, suggerisce fortemente l'esistenza di cellule staminali all'interno dell'epitelio mammario.

Recenti studi di isolamento e caratterizzazione di cellule staminali mammarie e di popolazioni progenitrici all'interno della ghiandola mammaria di topo e in quella umana forniscono ulteriori prove che l'epitelio mammario sia organizzato in modo gerarchico e che una singola cellula staminale mammaria (MaSC), che risiede nello strato basale / mioepiteliale, possa ricostituire funzionalmente una ghiandola mammaria dando origine a discendenze cellulari differenziate attraverso varie cellule progenitrici più limitate. Pertanto, un progenitore bipotente basale comune produce entrambe le due principali linee

epiteliali mammarie che danno origine alle cellule luminali e basali / mioepiteliali (Ming Luo et al.,2015).

A dimostrazione dell'esistenza di un compartimento staminale anche nel contesto della patologia tumorale, Al-Hajj e collaboratori hanno selezionato la componente carcinogenica all'interno di una popolazione eterogenea di cellule isolate da CM, sulla base dell'espressione di due marcatori di superficie, CD24 e CD44. Gli autori hanno infatti ottenuto la formazione del tumore inoculando in un topo 100 cellule con fenotipo  $CD44^+/CD24^{low}$ , mentre un numero superiore di cellule con fenotipo diverso non ha prodotto tumore (Al-Hajj et al., 2003). In aggiunta, i ricercatori hanno osservato che i tumori secondari generati da cellule  $CD44^+/CD24^{low}$ , comparati al tumore originario, mostravano la stessa complessità in termini di sotto-popolazioni fenotipicamente distinguibili. Inoltre, le CSCs sono risultate in grado di formare vasi sanguigni tumorali funzionali attraverso il transdifferenziamento in cellule endoteliali progenitrici, cellule endoteliali (EC) o cellule simili a quelle della muscolatura lisse vascolare.

Ciò ha dimostrato come le CSCs possano sia guidare l'inizio del tumore che mediare la metastasi (F. Yang et al.,2016). Sulla base di tali evidenze, il CM con un'alta percentuale di CSCs è correlato ad una maggiore probabilità di esito infausto. È tuttavia stato osservato che nella mammella del topo adulto le MaSCs sono molto rare e che la rigenerazione di popolazioni basali e luminali



è affidata a progenitori già fenotipicamente determinati verso il differenziamento basale o luminale (Van Keymeulen et al., 2011). Inoltre dati recenti suggeriscono che non solo i CM di tipo Luminal A e B originerebbero da cellule luminali, ma anche tumori Basal-like di tipo A e con amplificazione di Her2 (Visvader, 2009).

Mentre teorizzare che una cellula staminale, trasformandosi, generi una CSC è relativamente semplice, non altrettanto lo è affermare il processo che conduce una cellula differenziata a generare una CSC. Almeno in parte il processo potrebbe avere a che fare con la Transizione Epitelio Mesenchimale (epithelial mesenchymal transition, EMT) in cui una cellula epiteliale perde connessioni cellula-cellula con l'epitelio circostante ed acquista motilità ed un fenotipo fibroblastoide. La EMT avviene fisiologicamente durante lo sviluppo embrionale ma anche durante il processo di cicatrizzazione delle ferite ed è caratterizzata da perdita di E-caderina, marcatore del differenziamento epiteliale, ed espressione di vimentina, specifici fattori di trascrizione e marcatori di differenziamento mesenchimale. Le stesse peculiarità sono state associate a cellule staminali tumorali di mammella (BCSCs) facendo supporre una correlazione fra il processo di transizione epitelio mesenchimale e l'acquisizione del fenotipo staminale tumorale (Mani et al., 2008; Gupta et al., 2009).

Il modello dinamico ha una profonda ripercussione sugli approcci terapeutici che dovrebbero necessariamente tenere conto dell'eradicazione delle CSCs ma anche contemporaneamente delle popolazioni cellulari più differenziate, mirando ai meccanismi molecolari spesso non coincidenti, che ne consentono la propagazione (Smalley M et al., 2012).

Un approccio terapeutico promettente contro le CSCs consiste nel bersagliare le vie di segnale che promuovono la capacità di auto-rigenerazione. Sembra che questo processo sia largamente sostenuto dalla riattivazione di programmi molecolari embrionali mediati da Wnt, Hedgehog e Notch (Elshamy et al., 2013).

Il pathway Hedgehog (Hh) viene attivato dal legame di uno dei tre ligandi quali Sonic, Desert e Indian agli specifici recettori conducendo all'attivazione trascrizionale di fattori di trascrizione che regolano l'espressione di geni che codificano per markers di staminalità.

La via di Notch è notoriamente coinvolta nell'omeostasi e differenziamento di vari tessuti e tipi cellulari ma anche nella regolazione delle CSCs. Infatti, l'inibizione di tale via causa deplezione di CSCs e miglioramento della risposta alla chemioterapia (Qiu et al., 2013). Notch 1-4 sono proteine transmembrana con un dominio intracellulare ed uno extracellulare. Possono interagire con 5 ligandi (Delta-like 1-3 and Jagged 1-2) anch'essi proteine di membrana che espongono solo un dominio extra-cellulare. Il pathway si attiva per interazione

intercellulare ligando-recettore e produce il taglio del dominio intracellulare di Notch (NICD) ad opera di TACE o  $\gamma$ -segratase. NICD agisce come fattore di trascrizione che regola un programma di attivazione genica volto al mantenimento della staminalità (Du Z et al., 2010). L'attivazione della via di Notch stimola la formazione di mammosfere in vitro (Dontu et al., 2003), mentre la sua inibizione con inibitori di  $\gamma$ -segratase (Gamma Secretase Inhibitor, GSI) produce una riduzione della popolazione staminale tumorale (Bouras et al., 2008). L'utilizzo di GSI in terapia è un'ipotesi correntemente al vaglio per il trattamento di tumori della mammella (Han et al., 2011).

Un'altra via di segnale che regola il numero di cellule staminali in molti tessuti umani e murini è quella di Wnt. La sua deregolazione è associata a trasformazione tumorale. Il ruolo di Wnt è strettamente associato al suo effettore  $\beta$ -catenina, che è over-espresso in diversi tipi di cancro (Polakis et al., 2000). È stato inoltre visto che lo spegnimento della Wnt con doxorubicina all'interno del tessuto tumorale, risulta in una regressione del tumore mammario primario e delle metastasi polmonari in vivo nel topo (Gunther et al., 2003), come ulteriore dimostrazione dell'importanza di questo gene nella funzionalità delle CSCs.

#### ***1.3.4 Ruolo di p63 nella staminalità della ghiandola mammaria***

$\Delta$ Np63 è selettivamente distribuito nelle cellule basali sia degli epiteli stratificati che degli epiteli ghiandolari. Una distribuzione di questo tipo è coerente con il ruolo critico ricoperto da tale isoforma nella regolazione della staminalità e della proliferazione del compartimento basale, attraverso il controllo dei cicli di divisione asimmetrica da cui si originano le cellule progenitrici o transit-amplifying cells.

Nella normale ghiandola mammaria, p63 è confinato al compartimento basale/mioepiteliale. L'isoforma  $\Delta$ Np63 preserva la capacità autorinnovante delle BCSCs in parte promuovendone la quiescenza al punto che sembrerebbe necessaria una diminuzione dell'abbondanza di  $\Delta$ Np63 affinché avvenga l'attivazione delle cellule staminali e la successiva maturazione dei progenitori mammari. In linea con questo modello,  $\Delta$ Np63 è abbondante nelle BCSCs mentre risulta poco espresso o assente nei progenitori (Chakrabarti R. et al.,2014).

D'altra parte, l'espressione dell'isoforma TAp63 nei progenitori attiva l'espressione del ligando Indian del pathway Hh, promuovendo l'espansione consistente di tale compartimento cellulare. In contrasto con ciò, la repressione dell'espressione del ligando Indian dovuta all'espressione dell'isoforma  $\Delta$ Np63 nelle cellule staminali quiescenti preserva il loro stato inattivo.

L'isoforma  $\Delta$ Np63 risulta inoltre in capo alla promozione dell'espansione della sottopopolazione di BCSCs attraverso la diretta transattivazione del promotore Notch1 sopra menzionato (Du Z. et al.,2010). D'altro canto, l'attivazione di Notch 3 sembra essere invece coinvolta nel mantenimento dello stato quiescente ad opera di  $\Delta$ Np63 (Kent S. et al.,2011).

Nella tabella seguente, vengono riportati schematicamente i pathways cellulari che regolano i vari aspetti della staminalità nel contesto sia tumorale che fisiologico della ghiandola mammaria (Melino et al.,2015).

<b>Gene</b>	<b>Pathway</b>	<b>Processo coinvolto</b>	<b>Tessuto/organo</b>	<b>Validazione</b>
Sonic	Hedgehog	Autorinnovamento cellule staminali	Tumore mammario	si
Gli2	Hedgehog	Autorinnovamento cellule staminali	Tumore mammario	si
Ptch1	Hedgehog	Autorinnovamento cellule staminali	Tumore mammario	si
Indian	Hedgehog	Maturazione dei progenitori	Ghiandola mammaria	si
Fzd7	WNT	Autorinnovamento cellule staminali	Ghiandola mammaria	si
Notch1	Notch	Espansione delle CSCs	Ghiandola mammaria	si
Notch3	Notch	Quiescenza delle cellule staminali	Ghiandola mammaria	no

Nella patologia tumorale, un'aumentata espressione di  $\Delta$ Np63 in linee cellulari di CM risulta in un aumento della percentuale della sottopopolazione di cellule simil-staminali, della proliferazione cellulare e dell'incidenza di tumore in vivo in seguito a xenotrapianto (Du Z. et al.,2010). Tali evidenze permettono di

incentrare  $\Delta Np63$  nel CM come un fattore di inizio del tumore ed al tempo stesso come un potenziale marker delle BCSCs.

## Capitolo II

### SCOPO DELLA TESI

Nel 1998 è stato scoperto un nuovo gene appartenente alla famiglia di p53, noto con il nome di p63. Si tratta di un gene complesso, a cui fanno capo sei diverse isoforme generate grazie a fenomeni di splicing alternativo (isoforme  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) ed alla presenza di due distinti siti di inizio della trascrizione che danno luogo alle due principali isoforme di p63: TAp63 e  $\Delta$ Np63. P63 codifica per una proteina essenziale nello sviluppo e nel differenziamento dei tessuti epiteliali. La delezione del gene in modelli murini ha dimostrato il ruolo fondamentale di questo gene nel mantenimento dello strato germinativo dell'epidermide e nel suo differenziamento. Tuttavia non esiste ancora un accordo sul ruolo delle diverse isoforme in questo processo (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). In maniera analoga, studi su topi knock-out dimostrano chiaramente un ruolo di questo fattore di trascrizione nello sviluppo tumorale. Tuttavia, non è ancora chiarito in maniera univoca se si comporti da oncogene o da gene oncosoppressore (Flores et al., 2005; Mills et al., 2016). Questa visione controversa è probabilmente dovuta alle diverse e, a volte opposte, funzioni delle varie isoforme. Questo progetto si propone pertanto l'obiettivo di capire il ruolo delle diverse isoforme di p63 nello sviluppo tumorale, utilizzando come modello di CM una linea di CSCs esprimente sia TAp63 $\alpha$  che  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , derivata da pezzo chirurgico di CM e propagata secondo le modalità di coltivazione in

vitro delle mammosfere indicate da Dontu e colleghi (Dontu et al., 2003). Informazioni preliminari sul ruolo funzionale delle varianti amino-terminali nel cancro erano state già ottenute da dati pregressi (non mostrati), prodotti nel laboratorio di afferenza, in seguito ad esperimenti di sovra-espressione delle due varianti di p63.

Nelle cellule sovra-esprimenti TAp63, i livelli di K5, indicativi di staminalità, sono risultati diminuiti mentre quelli di K8 aumentati, sia rispetto al controllo che alla linea sovra-esprimente  $\Delta Np63$ .

La sovra-espressione dell'isoforma  $\Delta Np63$  sembrava tuttavia ridurre la capacità proliferativa di queste cellule, mentre l'isoforma TAp63 non mostrava differenze significative rispetto al controllo. D'altra parte la linea sovra-esprimente l'isoforma  $\Delta N$  ha fatto registrare un tasso di incidenza nello sviluppo dei tumori in seguito a xenotrapianto in modello murino pari all'85% dei casi, molto più elevato rispetto alla linea sovra-esprimente l'isoforma TA e alla linea di controllo.

I dati sembravano quindi suggerire che  $\Delta Np63$ , pur conferendo alle BCSCs uno svantaggio di proliferazione *in vitro*, fosse in grado di indurre maggiormente la formazione del tumore come possibile riflesso dell'acquisizione di un fenotipo più staminale.



Dal momento che il modello di BCSCs da noi utilizzato esprime entrambe le varianti amino-terminali di p63, i risultati degli esperimenti in over-espressione non potevano essere valutati al netto dell'interferenza dei livelli endogeni delle diverse isoforme.

Con l'intento di semplificare il sistema e rendere più immediata l'interpretazione dei dati, abbiamo quindi generato BCSCs esprimenti una sola delle varianti amino-terminali di p63 per delezione selettiva dell'altra. Un'ulteriore linea è stata generata per il knock-out totale di p63. Le linee sono state ottenute mediante la tecnica di modificazione genetica CRISPR-Cas-9.

## Capitolo III

### MATERIALI E METODI

#### 3.1 Purificazione e coltura delle CSCs

CSCs di mammella sono state purificate da tessuto tumorale proveniente da pazienti sottoposte a resezione di CM, in conformità con gli standard etici della Commissione Istituzionale sulla Sperimentazione Umana (autorizzazione n. CE-ISS 09/282). La diagnosi istologica si è basata su caratteristiche microscopiche delle cellule di carcinoma che ne determinano il tipo istologico e grado.

I frammenti di tessuti tumorali sono stati ampiamente lavati in soluzione fisiologica contenente antibiotici e incubate in DMEM/F12 (1: 1) addizionato di penicillina (500 UI/ml), streptomina (500 mcg/ml) e anfotericina B (1,25 mg/ml). La digestione enzimatica è stata effettuata utilizzando collagenasi (1,5 mg/ml) e ialuronidasi (20 mg/ml) in DMEM addizionato di una combinazione di antibiotici/antimicotici per 1 h a 37°C. La sospensione cellulare ottenuta è stata poi piastrata in flask ultra-low attachment (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) in mezzo privo di siero DMEM/F12 (1:1) integrato con 6 mg/ml di glucosio, 1 mg/ml di NaHCO<sub>3</sub>, 5mM HEPES, 2mM L-glutamina, 4 mg/ml di eparina, 4 mg/ml di BSA, 10 ng/ml di  $\beta$ FGF, 20 ng/ml di EGF, 100 mg/ml di transferrina sale di sodio, 25 mg/ml di insulina, 9,6 mg/ml di

putrescina, 30nM di sodio selenite, e 20nM di progesterone ad una concentrazione finale di  $3 \times 10^3$  cellule/ml ad una temperatura di 37°C, in atmosfera umidificata del 5% (v/v) di CO<sub>2</sub> in aria.

Queste condizioni di coltura selezionano le cellule tumorali staminali che proliferano lentamente, dando vita ad aggregati di cellule tumorali, chiamati "sfere" (Todaro et al., 2007). Le CSCs sono state testate per la loro capacità di generare xenotrapianti tumorali e replicati istologici del tumore originario nel topo.

### **3.2 Delezione selettiva delle due varianti amminoterminali di p63, TAp63 e ΔNp63, e knock-out totale della proteina tramite il sistema CRISPR-Cas9**

#### ***3.2.1 Il sistema CRISPR-Cas9***

Nell'ambito dell'ingegneria genetica, Il sistema CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9) è una tecnologia enzimatica di modificazione del DNA, potente, efficiente, economica ed estremamente versatile. Può essere finalizzata al conseguimento di vari scopi: dal knock-out di un intero gene, alla modificazione del suo trascritto fino anche alla sostituzione di un trascritto con un altro. Le applicazioni, similmente, sono le più svariate: dalla ricerca di base, con la modificazione specifica di geni di interesse, alla terapia genica, con la reversione di mutazioni patogenetiche.

Il sistema CRISPR-Cas9 si basa sul meccanismo immunitario di difesa antivirale dei batteri, che utilizza delle endonucleasi guidate da RNA per

distruggere materiale genetico esogeno. Questi microrganismi sintetizzano degli RNA sentinella che in primo luogo identificano il DNA del virus e successivamente procedono alla sua eliminazione per digestione da parte della endonucleasi Cas (Terns et al., 2014).

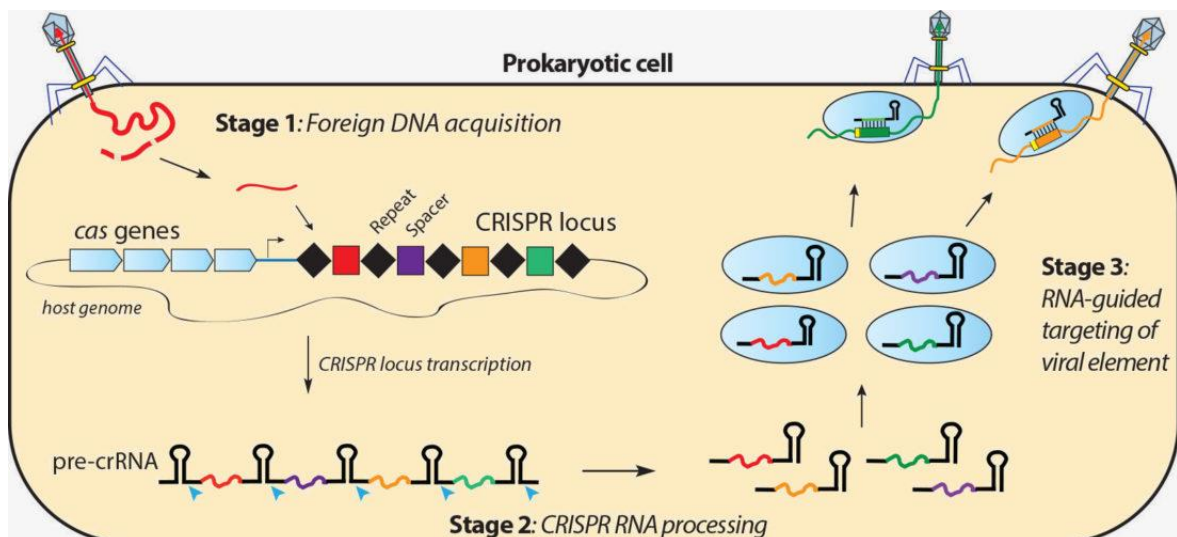
Nel dettaglio, i CRISPRs sono *loci* non codificanti del genoma dei procarioti. Si tratta di matrici di ripetizioni di una piccola sequenza intervallate da altrettanto piccole sequenze variabili (spacer). Queste ultime si abbinano perfettamente a sequenze di genoma del virus aggressore (protospacer). Di conseguenza, la trascrizione dei loci CRISPR e successivo processamento dei trascritti, produce CRISPR-(cr)RNAs composti da due domini funzionali: una sequenza, derivata dal genoma dell'aggressore (spacer), che riconosce il bersaglio (protospacer) sul DNA o RNA virale, fiancheggiata dalla sequenza ripetuta CRISPR, che è responsabile del reclutamento della endonucleasi Cas in un complesso effettore ribonucleoproteico (crRNP).

Le sequenze spacer acquisite rappresentano quindi un archivio genetico delle infezioni precedenti. La selezione dei protospacer è determinata in parte anche dal riconoscimento specifico delle cosiddette sequenze PAM (Motivi Adiacenti Protospacer) presenti nel plasmide invasivo e nei genomi fagici. La mancanza di sequenze di riconoscimento PAM all'interno delle ripetizioni dirette dei loci batteri CRISPR elimina il rischio di self-targeting ed auto-taglio da parte dei sistemi CRISPR-Cas.

Nei batteri ci sono 3 tipi di sistema CRISPR-Cas. Il Tipo II, che si avvale della nucleasi Cas9, è stato ad oggi ampiamente utilizzato con successo come strumento di modificazione del genoma di lieviti e batteri ma anche di linee cellulari umane (Cho et al., 2013). Il CRISPR-Cas di Tipo II, oltre a Cas9 e crRNA, necessita di un secondo RNA, il tracrRNA, che agisce in trans per consentire la formazione del complesso crRNP. Tuttavia, il crRNA e il tracrRNA possono essere ingegnerizzati per fondersi in un unico RNA chiamato RNA guida (sgRNA, singolo RNA guida). A questo punto è sufficiente la compresenza all'interno della cellula di una proteina, la Cas9, e di un RNA, il sgRNA per produrre una rottura ad estremità piatte su entrambi i filamenti del DNA bersaglio sul gene di interesse. Il resto del lavoro sarà portato a termine dalla cellula stessa con l'attivazione di meccanismi endogeni di riparo del DNA. A seconda del sistema di riparo che si attiva è possibile ottenere diversi tipi di mutazione. Se insieme alla Cas9 e al sgRNA viene fornito alla cellula anche uno stampo per la correzione, un DNA con braccia di omologia che ne permettono l'appaiamento con il bersaglio, si attiverà un sistema di riparo per ricombinazione omologa ad elevata fedeltà (Homology-Directed Repair, HDR) sulla base delle specifiche indicazioni di sequenza fornite dallo stampo. In questo modo, è possibile per esempio sostituire una copia mutata di un gene mutato con una funzionale. In assenza di un modello invece, la cellula riparerà la rottura del DNA con il meccanismo non omologo

di giustapposizione delle estremità (Non-Homologous End-Joining, NHEJ), che produce inserzioni o delezioni casuali con conseguente slittamento della cornice di lettura e formazione di un codone di STOP prematuro. L'mRNA trascritto verrà probabilmente degradato ed in ogni caso non si tradurrà in proteina.

Per la delezione selettiva delle isoforme TA e  $\Delta N$  di p63 (NG\_007550.1) e per il knock-out completo della proteina nelle BCSCs, abbiamo sfruttato il NHEJ. La Cas9 è stata guidata specificamente sull'esone caratteristico di ciascuna delle due isoforme da sgRNA appositamente progettate (Fig.6). Sia la Cas9 che sgRNA sono state veicolate nella cellula mediante trasfezione di un costrutto di co-espressione per entrambe.



**Fig.5:** Descrizione della formazione e del processamento di un locus CRISPR (<http://2017.igem.org>)

### ***3.2.2 Preparazione dei costrutti di co-espressione per Cas9 e sgRNA***

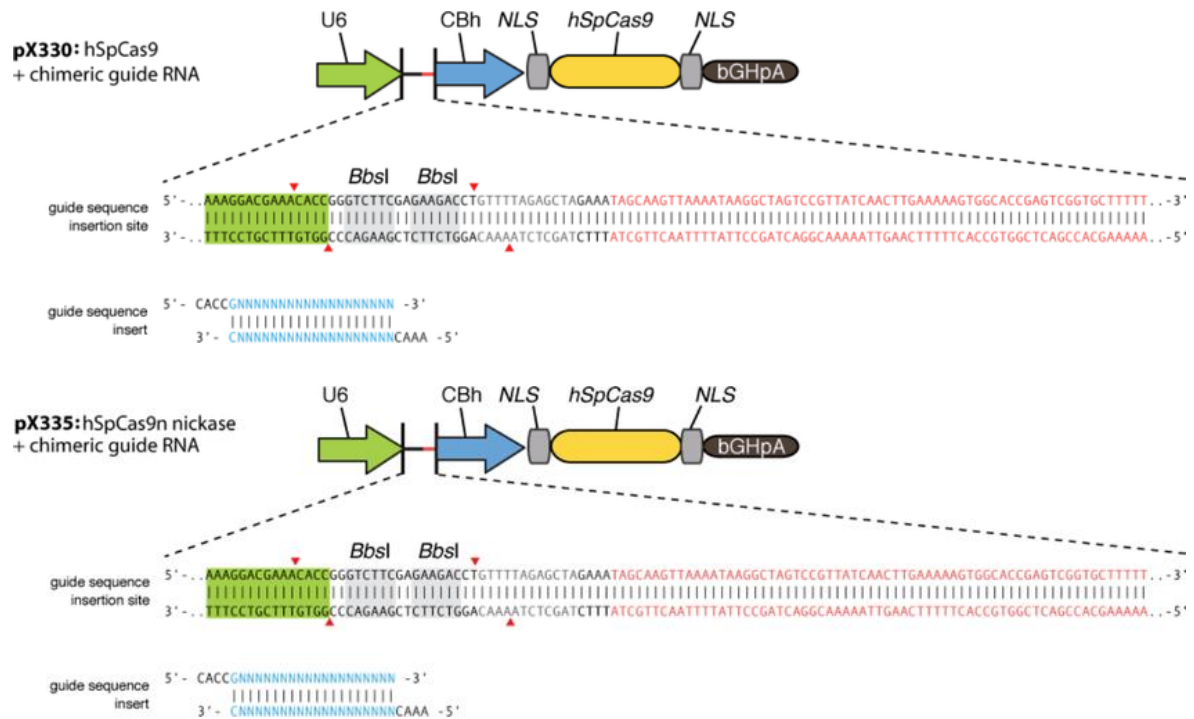
I vettori da noi utilizzati sono:

-pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene)

-pX335-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9n(D10A)(Addgene)

Entrambi contengono due cassette di espressione: una per la Cas9 di *Streptococcus Pyogenes*, ed una per la sgRNA. Grazie alla presenza del sito di restrizione BbsI, che in seguito al taglio produce sui due filamenti del vettore estremità adesive diverse, è possibile inserire nello scheletro non variabile della sgRNA la sequenza guida variabile abbinata al sito bersaglio, affiancata dalle estremità adesive per il vettore, debitamente orientate. La principale differenza fra i due vettori risiede nel tipo di Cas9 espressa, wild type (WTCas9) per px330, e D10A nikase (Cas9n) per px335 come mostrato negli schemi sottostanti. Proprietà e applicazioni dei due enzimi sono descritte di seguito.

Il filamento 5' - 3' della sgRNA viene per convenzione definito filamento “top”, mentre il filamento 3' - 5' viene chiamato “bottom”.

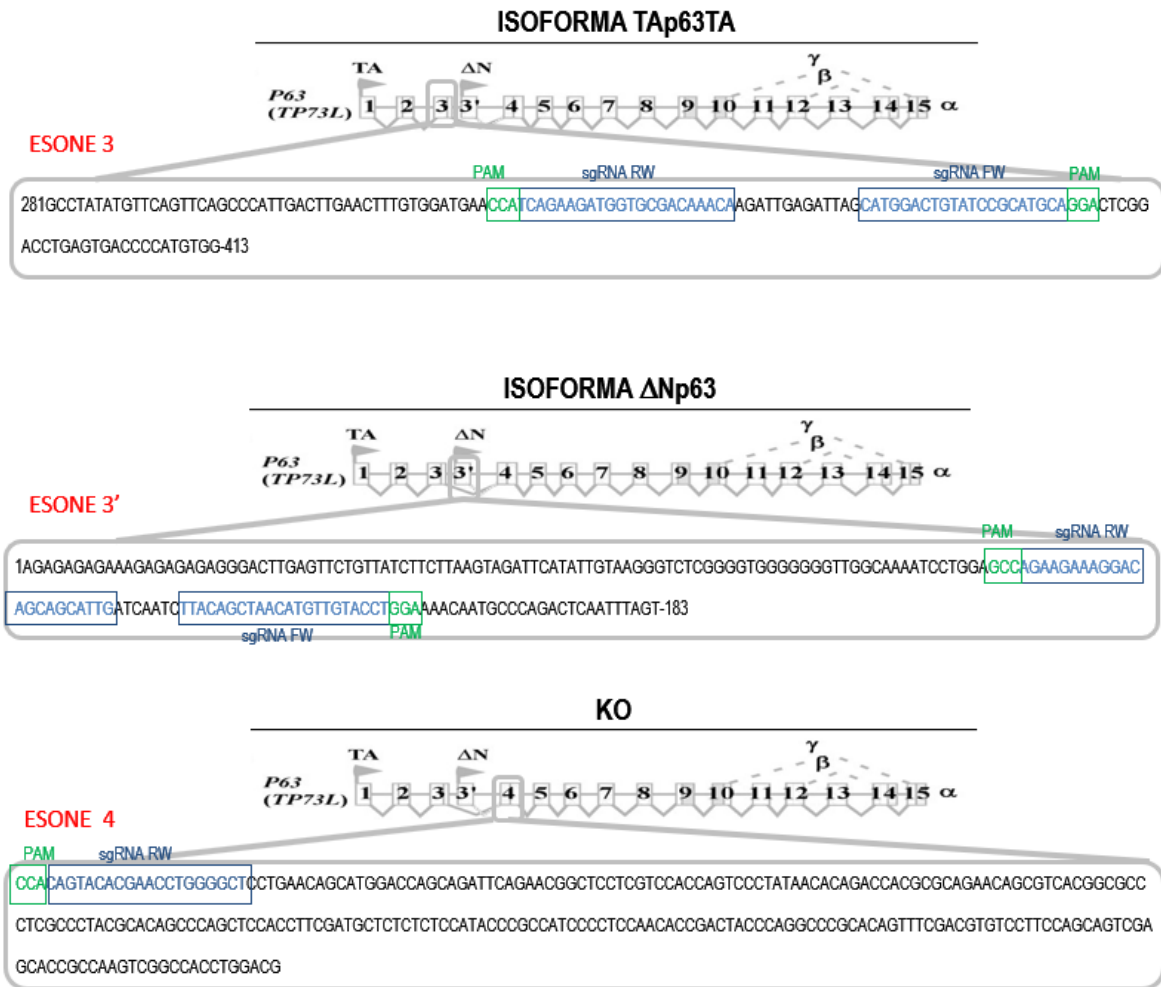


### 3.2.3. Identificazione delle sequenze bersaglio

Il bersaglio (o protospacer) è una qualsiasi sequenza di 20 bp all'interno del locus da modificare immediatamente seguita da una sequenza PAM (Protospacer Adjacent Motif). La PAM è diversa da organismo ad organismo. Per la Cas9 di *Streptococcus Pyogenes*, essa è una sequenza di tre nucleotidi, 5'-NGG, posta al 3' della sequenza bersaglio. Di conseguenza, l'identificazione del bersaglio può avvenire anche manualmente, semplicemente scandagliando la sequenza di interesse alla ricerca di sequenze PAM. Per il nostro lavoro ci siamo serviti invece di uno strumento disponibile *online*, il CRISPR Design Tool, (<http://crispr.mit.edu>), che non solo restituisce la lista completa delle sequenze bersaglio ma le classifica in base alla loro qualità privilegiando quelle



che hanno minore probabilità di veicolare la Cas verso tagli non specifici su sequenze simili ma non identiche. Proprio per limitare la possibilità di mutazioni indesiderate e sfruttando la presenza in Cas9 di due domini indipendenti per il taglio di ciascun emifilamento del DNA bersaglio, è stato possibile usufruire della forma mutata della Cas9 in grado di tagliare solo uno dei due emifilamenti (Cas9n, Cas9 nickase). Con Cas9n e la combinazione di due sgRNA, orientate e spaziate in maniera appropriata, è possibile introdurre simultaneamente tagli in singola elica su entrambi gli emifilamenti della sequenza di interesse. Come per la rottura su entrambi i filamenti generata dal Cas9WT, si attiverà il sistema di riparo NHEJ con il vantaggio però di una maggiore specificità. Si abbassa infatti notevolmente la probabilità che si verifichino due tagli ravvicinati e aspecifici su emifilamenti opposti.



**Fig. 6:** I tre schemi mostrano le sequenze bersaglio del gene TP63 per eliminare l'isoforma TAp63, l'isoforma ΔNp63 o tutto il gene. Per TAp63, i siti di taglio degli emifilamenti si trovano sull'esone 3; per ΔNp63 nell'esone 3' mentre per il KO il sito di taglio del doppio filamento si trova sull'esone 4, comune ad entrambe le isoforme. I riquadri in verde evidenziano le sequenze PAM mentre i riquadri blu circoscrivono le sequenze omologhe alle sgRNA.

Per TAp63 e ΔNp63 abbiamo scelto l'approccio della Cas9n mutata ed abbiamo quindi dovuto generare per ciascuna isoforma due costrutti di espressione per due sgRNA in px335 (Fig. 6) diretti su due bersagli debitamente spazati ed orientati all'interno dell'esone 3, per TAp63, e dell'esone 3', per ΔNp63.

Per il KO totale abbiamo sfruttato la WTCas9. È stato quindi sufficiente generare un solo costrutto di espressione in px330. La sequenza bersaglio è stata individuata all'interno dell'esone 4, comune ad entrambe le varianti amminoterminali di p63 (Fig. 6).

Le sequenze bersaglio scelte sono state:

-per TAp63 (TA<sup>-/-</sup>) nell'esone 3 del gene:

```

146821 ttgttgtaa caacagcatg agtatat tttt agtccctttc catgcctaac tcactttttt
146881 ctttcctatg tgtaggcct atatgttcag ttcagcccat tgacttgaac tttgtggatg
146941 aaccatcaga agatggtgcg acaaacaaga ttgagattag catggactgt atccgcatgc
147001 aggactcggga cctgagtgac cccattgtggg tgagtggcac aggctttctc ttcagtcttt
147061 gggccatgct atctatagct ctgttaaacc tgtcttttca gtcattgtgtg aaaaggcagg

```

-per DNp63 (DN<sup>-/-</sup>) nell'introne 3 del gene:

```

197941 gagttctggt atcttcttaa gtagattcat attgtaaggg tctcgggggtg ggggggttgg
198001 caaaatcctg gagccagaag aaaggacagc agcattgatc aatcttacag ctaacatggtt
198061 gtacctggaa aacaatgcc agactcaatt tagtgaggta aggattttag attttagcac
198121 tccattttaga gatgcttttt aatttttatt tttgtaaaaa aacttacgta tttgcggttc

```

-per K0 nell'esone 4:

```

216421 cgtgaggtcc atctctgtag aatgcattca cccatggatg cctttttttg gagcaatgat
216481 ccgtggcttc agcggctaatt attggggttt ctgggtgtcc ttgcagccac agtacacgaa
216541 cctggggctc ctgaacagca tggaccagca gattcagaac ggctcctcgt ccaccagtcc
216601 ctataacaca gaccacgcgc agaacagcgt cacggcgccc tcgccctacg cacagcccag
216661 ctccacccttc gatgctctct ctccatcacc cgccatcccc tccaacaccg actaccagg
216721 cccgcacagt ttcgacgtgt ccttcagca gtcgagcacc gccaagtgg ccacctggac
216781 ggtaagagca gcgggcacgc acatacctga ccccccaagt ccaaggatgg gcttcaccac

```

### 3.2.4. Preparazione e clonaggio degli inserti per le sequenze guida

Gli inserti per le sequenze guida sono stati sintetizzati in omologia con il bersaglio, senza la sequenza PAM, con l'eventuale aggiunta di una G al 5' per facilitare la trascrizione a partire dal promotore U6 e con l'aggiunta di code di complementarietà per l'inserzione nel sito di restrizione BbsI del vettore. Due oligonucleotidi, complementari ed antiparalleli, per ciascun inserto sono stati

sintetizzati dalla Integrated DNA Technologies (IDT, inc.). Le sequenze sono riportate nella tabella sottostante. In azzurro vengono evidenziate le sequenze complementari alle regioni tagliate dall'enzima di restrizione.

**Tabella 1:** Sequenze guida

sg.TA.F.Top <sup>a</sup>	5'-CACC <b>G</b> CATGGACTGTATCCGCATGC-3'
sg.TA.F.Bottom <sup>b</sup>	5'-AAACGCATGCGGATACAGTCCATG <b>C</b> -3'
sg.TA.R.Top <sup>c</sup>	5'-CACC <b>G</b> TTTGTGTCGCACCATCTTCTGA-3'
sg.TA.R.Bottom <sup>d</sup>	5'-AAACTCAGAAGATGGTGCACAA <b>A</b> C-3'
sg.ΔN.F.Top <sup>a</sup>	5'-CACC <b>G</b> TACAGCTAACATGTTGTACC-3'
sg.ΔN.F.Bottom <sup>b</sup>	5'-AAACGGTACAACATGTTAGCTGT <b>A</b> C-3'
sg.ΔN.R.Top <sup>c</sup>	5'-CACC <b>G</b> AATGCTGCTGTCCTTTCTTC-3'
sg.ΔN.R.Bottom <sup>d</sup>	5'-AAACGAAGAAAGGACAGCAGCATT <b>C</b> -3'
sg.KO.R.Top <sup>e</sup>	5'-CACC <b>G</b> AGCCCCAGGTTTCGTGTA <b>C</b> TG-3'
sg.KO.R.Bottom <sup>f</sup>	5'-AAACCAGTACACGAACCTGGGG <b>C</b> T-3'

**Legenda tabella 1:**

- <sup>a</sup> Filamento 5'→3' della guida, riferito all'emifilamento FW del DNA bersaglio;
- <sup>b</sup> Filamento 3'→5' della guida, riferita all'emifilamento FW del DNA bersaglio;
- <sup>c</sup> Filamento 5'→3' della guida, riferita all'emifilamento RW del DNA bersaglio;
- <sup>d</sup> Filamento 3'→5' della guida, riferita all'emifilamento RW del DNA bersaglio;
- <sup>e</sup> Filamento 5'→3' della guida complementare alla sequenza RW del DNA bersaglio;
- <sup>f</sup> Filamento 3'→5' della guida complementare alla sequenza RW del DNA bersaglio.

Per preparare l'inserto, ciascuna coppia di oligo è stata appaiata per complementarità e fosforilata in una mix di reazione così composta: 1 µl di sg.oligo.top (100 µM), 1 µl di sg.oligo.bottom (100 µM), 1µl di T4 Ligasi Buffer 10X (Promega), 1 µl di T4 Polinucleotide Kinasi (PKN, Promega), 6µl di ddH<sub>2</sub>O. La reazione è stata condotta nel termociclatore impostato come segue: 37°C per 30', 95°C per 5', 70°C per 5', ramp. down a 25°C, 1°C /s.

Il vettore è stato digerito con BbsI (R0539S, NEB) a 37°C per 2h nelle seguenti condizioni: 2 µg di plasmide, 6 µl di NEB Buffer 2.1 10X, 0.5 µl di BbsI (R0539S, NEB), ddH<sub>2</sub>O per un volume finale di 60 µl. Il vettore digerito è stato sottoposto a separazione elettroforetica su gel di Agarosio allo 0,8%, la banda corrispondente al vettore aperto è stata escissa e purificata con il Kit d'estrazione di DNA da gel QIAEX II (Qiagen). Il protocollo di estrazione prevede un'iniziale fase di solubilizzazione della banda escissa e binding del DNA incubando la porzione di gel a 50°C per 10 minuti con i Buffer QX1 e QIAEX II, quest'ultimo contenente particelle di silice che legano il DNA. Segue una centrifugazione che permette alle particelle di silice legate al DNA di essere concentrate sul fondo della provetta. Dopo la rimozione del surnatante, seguono 3 lavaggi, 1 con 500ul di buffer QX1 e 2 con 500ul di buffer PE. A questo punto il pellet di particelle di silice viene asciugato lasciando la provetta aperta per 10-15 minuti, a seguito dei quali vengono aggiunti 20ul di H<sub>2</sub>O per l'eluizione del DNA dalle particelle. A questo punto,

dopo la centrifugazione, nel surnatante sarà contenuto il DNA purificato. La reazione di ligazione è stata infine condotta con 100 ng di vettore digerito e 2  $\mu$ l di inserto appaiato e fosforilato, con il kit DNA Ligation Ver. 2.1 (6022, Takara). Il protocollo prevede la combinazione in rapporto 1:1 del vettore e dell'inserto in un volume finale di 10  $\mu$ l. Vengono poi aggiunti 5  $\mu$ l di Soluzione I contenente l'enzima T4 DNA ligasi, che agirà in incubazione a 16°C per 30 minuti. Dopo la fase di ligazione, il plasmide viene controllato per l'avvenuta acquisizione dell'inserto che provoca la rottura del sito di restrizione BbsI del vettore. Pertanto, in seguito a trattamento enzimatico e a separazione elettroforetica, è già possibile individuare la banda che corrisponde al vettore non digerito. Come ulteriore controllo, il DNA plasmidico ottenuto dalla banda di interesse, purificata con il protocollo QIAEX II già precedentemente descritto, viene sequenziato con metodo Sanger per l'ulteriore verifica della presenza effettiva dell'inserto.

### ***3.2.5 Propagazione e amplificazione di plasmidi in E. coli***

Tutti i plasmidi utilizzati nel lavoro sono stati propagati in E. coli Stbl3 (One Shot® Stbl3™ Chemically Competent E. coli). I batteri competenti sono stati trasformati con plasmide puro o prodotto di ligazione seguendo il protocollo specifico che prevede lo scongelamento, in ghiaccio, di un'aliquota di batteri alla quale vengono aggiunti 5  $\mu$ l di plasmide, mixando la soluzione

delicatamente. Segue un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio, a seguito dei quali viene eseguito uno shock termico incubando le cellule a 42°C per 45 secondi senza agitazione. Dopo questa fase, la provetta viene nuovamente posta in ghiaccio per 2 minuti e i batteri vengono risospesi in 250ul di S.O.C. medium. Successivamente, la provetta viene incubata a 37°C per un'ora in agitazione a 225 rpm per consentire la riattivazione dei batteri. Un' aliquota di 25ul di sospensione viene piastrata in terreno LB agar selettivo per Ampicillina, ed incubata a 37°C overnight. Ciò consentirà, il giorno successivo, di prelevare una colonia per l'allestimento della "MiniPrep". La colonia viene quindi messa in coltura in LB liquido, ad un volume finale di 5ml, ed incubata in agitatore a temperatura fissa di 37°C per 24 ore. Dopo aver prelevato e conservato un'aliquota di 500 ul della coltura finale, abbiamo estratto il DNA plasmidico dal restante volume di coltura utilizzando il kit QIAGEN Plasmid Mini, centrifugando preventivamente i batteri a 6000g per 15 minuti a 4°C. I batteri vengono risospesi in 300 ul di Buffer P1 e 300 ul di Buffer P2 ed incubati 5 minuti a temperatura ambiente. A questo punto vengono aggiunti 300ul di Buffer P3 pre-raffreddato per l'incubazione in ghiaccio per 5 minuti. Segue una fase di centrifugazione di 10 minuti a 16000g a 4°C che permette di ottenere il surnatante da caricare per gravità nella colonna di purificazione QIAGEN-tip, costituita da una resina a scambio ionico precedentemente riequilibrata con 1 ml di buffer QBT. La colonna viene quindi lavata per due volte con 2ml di

buffer QC ed infine eluita in 800ul di buffer QF. Il DNA plasmidico eluito viene precipitato aggiungendo 560ul di isopropanolo a temperatura ambiente, centrifugando successivamente a 15000g per 30 minuti a 4°C. Il surnatante viene quindi scartato ed il pellet di DNA lavato in 1 ml di etanolo al 70% e centrifugato a 15000g per 10 minuti. Il pellet nuovamente ottenuto viene lasciato asciugare a temperatura ambiente per 5-10 minuti, a seguito dei quali è possibile risospendere il DNA in buffer TE. Prima di utilizzare l'aliquota della MiniPrep per l'allestimento della MaxiPrep, il plasmide estratto viene nuovamente sequenziato con metodo Sanger. Per l'allestimento della MaxiPrep, viene effettuato un pre-inoculo con un'aliquota della MiniPrep, in 5 ml di LB addizionato con Ampicillina in agitazione per 6 ore. Successivamente si procede con l'inoculo in 200ml per 24 ore di terreno liquido LB. Per la successiva fase di purificazione del DNA plasmidico è stato utilizzato il kit HiSpeed Plasmid Maxi Kit. La coltura viene centrifugata a 6000g per 15 minuti a 4°C ed il pellet ottenuto viene risospeso in 10ml di Buffer P1 e 10 ml di Buffer P2, incubando 5 minuti a temperatura ambiente. A questo punto viene aggiunto il buffer P3, agitando la soluzione fin quando il colore blu comparso, svanisce. La soluzione viene quindi caricata nella cartuccia QIAfilter ed incubata 10 minuti a temperatura ambiente, in seguito ai quali è possibile rimuovere il tappo inferiore della cartuccia QIAfilter, inserire lo stantuffo e filtrare il lisato all'interno di un HiSpeed Tip precedentemente equilibrato con 10ml di buffer



QBT. L'HiSpeed Tip viene poi lavato con 60ml di Buffer QC ed il DNA viene eluito in 15ml di Buffer QF. Per precipitare il DNA vengono aggiunti 10ml di isopropanolo per 5 minuti. La miscela di eluato e isopropanolo viene inserita in una siringa da 30ml e filtrata all'interno del QIAprecipitator, che viene successivamente lavato con 2ml di etanolo al 70% ed asciugato flussando aria attraverso una siringa vuota. L'eluizione avviene in 5ml di Buffer TE.

### ***3.2.6. Trasfezione dei costrutti di co-espressione per Cas9 e sgRNA in BCSCs ed isolamento di cloni mutati da singola cellula***

4 µg di sgRNA-KO-px330 sono stati veicolati in BCSCs ( $5 \times 10^5$  cellule) tramite lipofezione con LIPOFECTAMINE™ 2000 (Invitrogen), in co-trasfezione con 1 µg pEGFP-C3. Al momento della trasfezione le cellule devono raggiungere il 70-90% di confluenza. 5ul di lipofectamina sono stati diluiti in 50ul di Opti-DMEM ed aggiunti in rapporto 1:1 con il DNA da veicolare. Dopo un'incubazione di 5 minuti, la miscela viene aggiunta alle cellule in incubazione 1-3 giorni a 37°C. Per la delezione di TAp63 e ΔNp63 è stata condotta una co-trasfezione a 3 plasmidi con pEGFP-C3 (1 µg) e i con i due costrutti sgRNAp335. Nello specifico, per TAp63, sgRNA-TA.F\_px335 (3 µg) in combinazione con sgRNA-TA.R\_px335 (3 µg); per ΔNp63, sgRNA-ΔN.F\_px335 (3 µg) in combinazione con sgRNA-ΔN.R\_px335 (3 µg).

A 48 hrs dalla trasfezione, le cellule trasfettate sono state individuate per fluorescenza grazie all'espressione della GFP e ripiastrate a singola cellula in pozzetto di piastra a 96, sfruttando l'unità di deposizione automatica in piastra del BD FACSAriaIII™ Cell Sorter (BD Biosciences).

I cloni di BCSCs così generati da singola cellula sono stati coltivati fino a confluenza nel pozzetto e replicati in un'altra piastra a 96 pozzetti. Una delle due piastre è stata utilizzata per l'analisi molecolare di mutazione del locus bersaglio.

### ***3.2.7 Analisi di mutazione del locus bersaglio e selezione dei cloni positivi***

Raggiunta la confluenza in pozzetto da 96, le cellule di ciascun clone sono state lisate direttamente in piastra ed il DNA è stato estratto. La porzione bersaglio del gene d'interesse è stata amplificata tramite PCR ed il prodotto di PCR purificato e stato sequenziato alla ricerca di variazioni della cornice di lettura. L'estrazione del DNA è stata condotta con QuickExtract™ DNA Extraction Solution (epicentre), con 10 µl di soluzione per pozzetto, incubando 6 minuti a 65°C. Segue un'incubazione di 2 minuti a 98°C a seguito dei quali 2 µl di lisato sono stati amplificati in PCR nella seguente reazione: 5 µl di 5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer, 1.5 µl di MgCl 7,5 nM, 0.5 µl di dNTPs (10mM ognuno), 1 µl di ciascun primer 10 µM (Tab. 9), 0.125 µl GoTaq® DNA Polymerase (M300Promega). Il programma del termociclatore è stato

impostato come segue: 95°C per 2', 95°C per 30'', 56°C per 30'', 72°C per 10'', 35 cicli. La qualità del prodotto di PCR è stata valutata per elettroforesi su gel di agarosio e l'amplificato è stato purificato con QIAEX II (Qiagen) secondo le istruzioni della casa produttrice. La presenza di mutazioni con slittamento della cornice di lettura è stata valutata tramite sequenziamento diretto, con metodo Sanger.

**Tab. 2:** Primer per PCR

LINEA CELLULARE	TIPO DI PRIMER	SEQUENZA
KO	FORWARD	5'-AATGATCCGTGGCTTCAGCG-3'
	REVERSE	5'-ATGGAGAGAGAGCATCGAAGG-3'
TA <sup>-/-</sup>	FORWARD	5'-GCCTATATGTTTCAGTTCAGCCC-3'
	REVERSE	5'-ACATGGGGTCACTCAGGTCC-3'
DN <sup>-/-</sup>	FORWARD	5'-TCATATTGTAAGGGTCTCGGGG-3'
	REVERSE	5'-CTCACTAAATTGAGTCTGGGC-3'

### ***3.3 Western blot per la verifica della delezione selettiva***

I pellet cellulari sono stati raccolti per centrifugazione, lavati in PBS e risospesi con il tampone di lisi, She Lysis Buffer (SLB) così composto: TRIS HCl pH8 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, 10% glicerolo, MgCl 1 mM, TRITON X-100 1%. Dopo un'incubazione di 20' in ghiaccio, i lisati cellulari sono stati centrifugati a 13000rpm, 4°C per 15'. Il surnatante è stato

recuperato e la concentrazione proteica è stata determinata con il metodo Bradford. I campioni sono stati preparati per la corsa elettroforetica mediante aggiunta di tampone di corsa e denaturazione per 8' a 98°C. La separazione delle proteine in base al loro peso molecolare è stata ottenuta per migrazione su gel di poliacrilammide al 10% (SDS-PAGE), sotto l'effetto di una tensione pari a 120 mV a temperatura ambiente, in tampone Tris-Glicina-0.1% SDS, su apparato Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Le proteine sono state quindi elettrotrasferite su membrana di PVDF (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), in soluzione tampone 25 mM Tris-base, 192 mM glicina e metanolo al 20%, mediante applicazione di una corrente elettrica pari a 300mA, per 2h a 4°C. Ciascun filtro è stato lavato con PBS-Tween20 (0.05%), bloccato per 1h con una soluzione di PBS addizionata di 0.05% (v/v) Tween-20, 5% latte non grasso liofilizzato, a temperatura ambiente. I filtri sono stati quindi incubati per tutta la notte con l'anticorpo primario diluito in soluzione bloccante, a 4°C, su un supporto basculante. Il giorno seguente i filtri sono stati lavati per 4 volte in PBS-Tween20 (0.05%) per 5', ed incubati per 1h, a temperatura ambiente, su un supporto basculante, con il corrispondente anticorpo secondario coniugato alla perossidasi di rafano (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), diluito 1:20000 in soluzione bloccante. Dopo altri 4 lavaggi in PBS-Tween20 (0.05%), le bande relative a ciascun immunocomplesso sono state rivelate mediante il sistema di

chemiluminescenza Super Signal (Thermo Scientific), contenente il substrato per la perossidasi, e successiva impressione di lastra autoradiografica (Hyperfilm, GeHelcare).

L'anticorpo primario utilizzato per la verifica della corretta espressione delle isoforme nelle cellule sottoposte a CRISPR-Cas9 è il seguente: anti-p63 (clone Y4A3, P3362, SigmaAldrich), anti- $\beta$ -Actin (clone AC-15, A5441 Sigma-Aldrich), capace di riconoscere entrambe le isoforme della proteina.

### ***3.4 Saggio di proliferazione cellulare***

Le BCSCs sono state piastrate in piastre a 6 pozzetti ( $5 \times 10^4$  cellule/ml o  $7,5 \times 10^4$  cellule/ml) e coltivate, come già descritto, in condizioni di staminalità. Ad intervalli di tempo stabiliti (24hrs, 48hrs e 72hrs), le cellule di ciascun pozzetto sono state raccolte ed incubate con il colorante trypan blu, al fine di identificare e contare le cellule vive come quelle che escludono il colorante. I risultati mostrati sono la media di tre esperimenti indipendenti, ciascuno eseguito in doppio.

### ***3.5 Analisi citofluorimetrica di marcatori di superficie***

L'analisi citofluorimetrica di marcatori di superficie è stata effettuata per le seguenti proteine di membrana: CD24, CD44, CD29, CD49f e Vimentina. Gli anticorpi utilizzati sono: anti-CD24-PE-Cy7 (561.646, BD Pharmingen); anti-

CD44-APC (559.942, BD Pharmingen); anti-CD49f-APC 130-100-147, Miltenyi Biotec; anti-CD29-PE (130-101-275, Miltenyi Biotec); Anti-Human Vimentin-PE, clone RV202 (562337, BD Pharmingen). Le cellule sono state lavate in PBS, risospese in 100 µl di anticorpo specifico diluito in 0,5% di albumina serica bovina in PBS e incubate per 20' a temperatura ambiente al buio. Esclusivamente per la marcatura anti-Vimentina è stato necessario un previo passaggio di fissazione e permeabilizzazione tramite incubazione per 10' in 100 µl di PFA 1%, seguita da un lavaggio in PBS e successiva incubazione per 5' in 100 µl di TRITON 0.1%. I campioni così marcati sono stati lavati in PBS, risospesi in 200µl di PBS e conservati al buio fino all'acquisizione mediante citofluorimetro (FACSCantoII, BDBiosciences). Le analisi dei dati sono state condotte con il software FACSDiVa (BDBiosciences).

### ***3.6 Analisi del ciclo cellulare***

La citometria a flusso permette di analizzare le fasi del ciclo cellulare e il grado di apoptosi valutando il contenuto di DNA cellulare, se i campioni vengono opportunatamente preparati e marcati. Le cellule sono state raccolte, separate con accumax, fissate in etanolo al 70% e lasciate almeno 24h a -20°C. I campioni sono stati poi lavati in PBS e incubati a 37°C per 20' con RNasi A (13 KU/ml) e altri 20' con ioduro di propidio (50 mg/ml). Successivamente i

campioni sono stati acquisiti al citofluorimetro (strumento FACSCanto II, BD Biosciences). 20000 eventi sono stati analizzati utilizzando il software FACSDIVA BD (BD Biosciences).

### ***3.7 Esperimento di inoculo in modello animale***

Per modello animale o modello biologico si intende un sistema biologico complesso che, contenendo determinati livelli di organizzazione e obbedendo a specifiche condizioni, viene usato per comprendere il “sistema biologico” umano, con il quale condivide delle affinità di comportamento per analoghe funzioni fondamentali.

Nella scelta di un particolare modello animale devono essere fatte delle considerazioni: similarità di condizione, livello della scala zoologica, fisiologia dei vari sistemi, struttura dei tessuti e tipo di sviluppo embrionale. Devono inoltre essere valutate l’attuabilità e la fattibilità, quindi la durata della vita del modello, il tempo per ottenere le risposte, l’economicità del modello e delle modalità per ottenere risposte, come anche il tempo di rilevamento dei dati.

Gli esperimenti *in vivo* condotti sono stati effettuati per valutare la capacità di formare il tumore delle nostre linee cellulari con mutazioni di p63 in relazione alle BCSCs originarie. In base a quanto detto sopra, la scelta del nostro modello animale è ricaduta su topi NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immune-deficient) femmine.

I topi sono stati inoculati con le linee cellulari tumorali staminali di mammella alla terza settimana di vita, sotto la cute, sul fianco destro. Gli inoculi sono stati preparati in Matrigel (Cltrex Basement Membrane Extract –phenol red free-3432-005-01, TREVIGEN) diluito 1:6 con PBS con una quantità di cellule pari a  $5 \times 10^3$  per ogni campione. Sono stati inoculati sei topi per ogni condizione, quindi BCSCs WT, TA<sup>-/-</sup>, ΔN<sup>-/-</sup>e KO. È stato monitorato l'eventuale sviluppo di tumori e gli animali sono stati sacrificati al raggiungimento di un volume del tumore pari a 1,5 cm.

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati nel rispetto della normativa vigente secondo il Decreto legislativo del 04 marzo 2014 N. 26 - Attuazione della Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici.



## Capitolo IV

### RISULTATI

Nel tentativo di chiarire il ruolo di p63 nell'esordio e nella progressione del carcinoma mammario, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sullo studio delle singole varianti ammino-terminali, TAp63 e  $\Delta$ Np63, in un modello di BCSCs.

Il western blot in figura 7 A, conferma l'espressione attesa di  $\Delta$ Np63 $\alpha$  nella linea TA<sup>-/-</sup>, l'espressione di TAp63 $\alpha$  nella linea  $\Delta$ N<sup>-/-</sup> e la totale down-regolazione di p63 nella linea KO, rispetto alle BCSCs di origine (WT).

#### 4.1 Caratterizzazione delle linee cellulari ottenute tramite CRISPR-Cas9

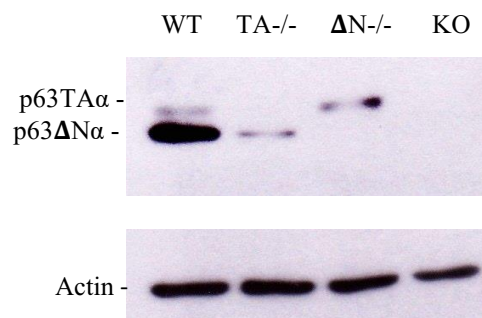
Le linee generate tramite il sistema CRISPR-Cas9 sono state caratterizzate per il ritmo di proliferazione cellulare, ciclo cellulare, espressione di marcatori di superficie e capacità di generare tumori *in vivo*.

Dalla curva di crescita (Fig. 7 B) si evince che la linea cellulare TA<sup>-/-</sup> e la linea KO hanno un ritmo di proliferazione inferiore se paragonate alla linea controllo e alla linea  $\Delta$ N<sup>-/-</sup> (circa 3,7X10<sup>5</sup> cellule per  $\Delta$ N<sup>-/-</sup> e WT, contro le circa 2,5X10<sup>5</sup> cellule per TA<sup>-/-</sup> e KO, dopo 72 ore dal piastramento).

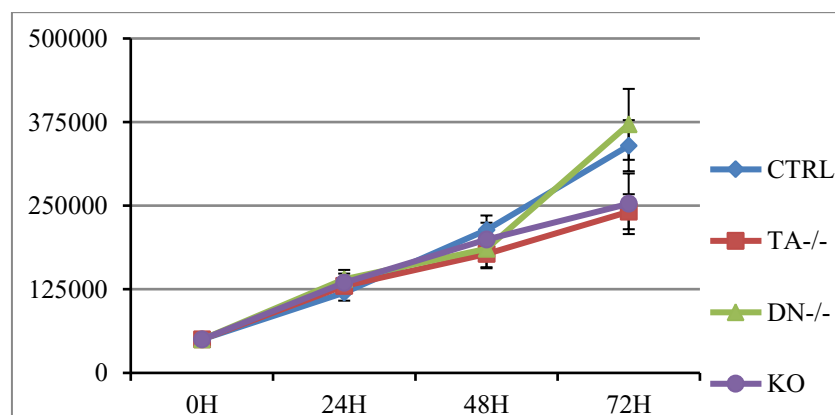
L'analisi citofluorimetrica per incorporazione di ioduro di propidio dei cicli cellulari (Fig. 7 C) non ha evidenziato significative discrepanze fra le varie

linee, né un particolare accumulo di cellule in una determinata fase del ciclo. Tuttavia è interessante notare che dalla sovrapposizione delle curve relative alle quattro linee (Fig. 7 D) si evidenzia uno spostamento verso destra di tutte le fasi del ciclo della linea TA<sup>-/-</sup>. Ciò sta ad indicare che la linea esprime solo la isoforma ΔNp63 contiene una maggiore quantità di DNA rispetto alle altre linee. Questo dato è stato confermato dall'analisi del cariotipo, che ha rivelato la presenza di un numero di cromosomi quasi raddoppiato nella linea TA<sup>-/-</sup> rispetto alle altre tre linee (Fig. 7 E). La mancanza di TAp63 in combinazione con l'espressione dell'isoforma ΔN sembra conferire instabilità genomica alla linea cellulare con accumulo di cromosomi extranumerari.

A

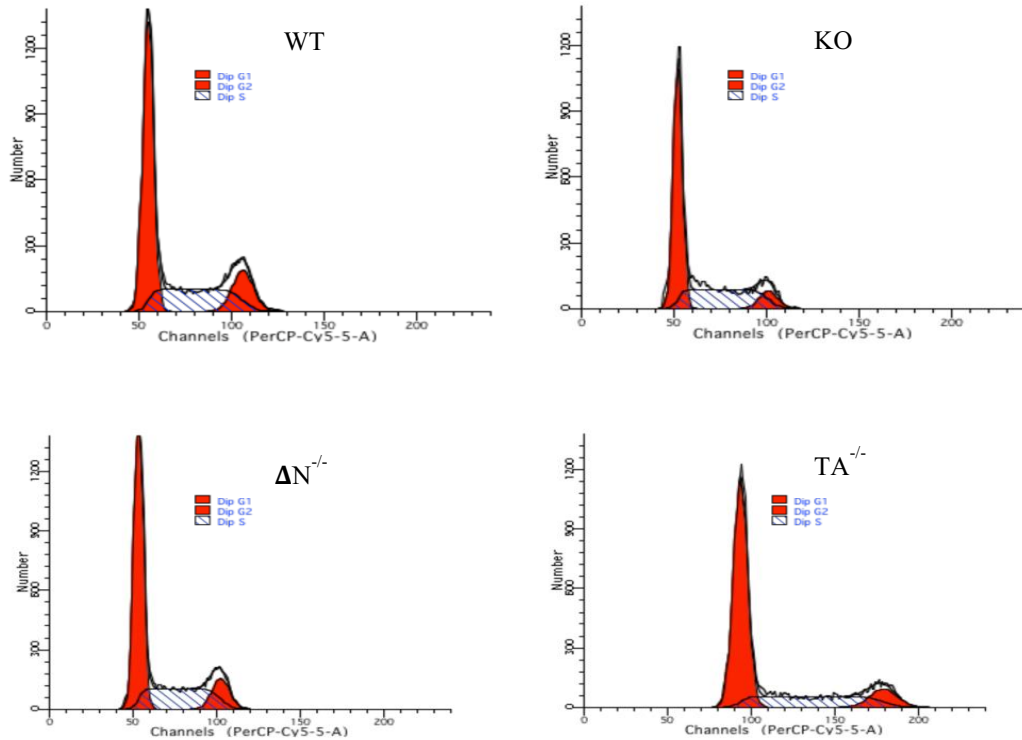


B

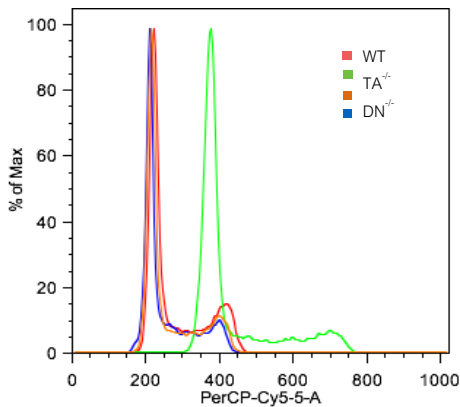


## CICLO CELLULARE

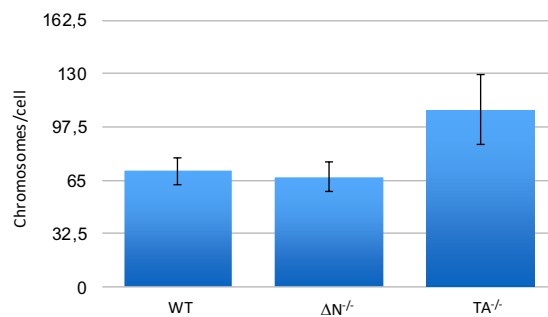
C



D



E



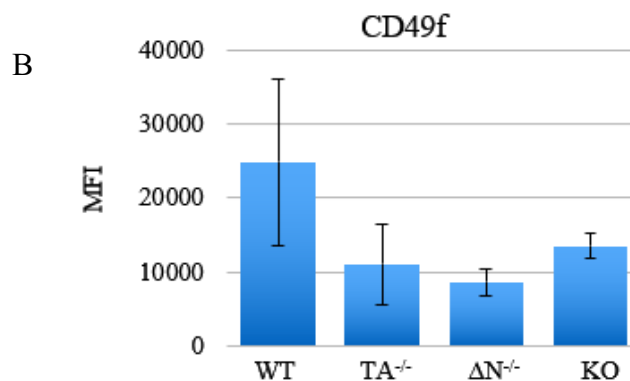
**Fig.7:** Il WB (A) mostra l'espressione di entrambe le isoforme nella linea di controllo (WT), l'espressione della isoforma  $\Delta Np63$  nella linea  $TA^{-/-}$  e l'espressione dell'isoforma TAp63 nella linea  $\Delta N^{-/-}$ ; KO non presenta nessuna delle due isoforme; l'actina è un controllo di caricamento. La curva di crescita (B) mostra gli andamenti della crescita cellulare della linea controllo (in blu), di  $TA^{-/-}$  (in rosso), di  $\Delta N^{-/-}$  (in verde) e della linea KO (in viola), costruite su quattro conte cellulari al tempo 0, 24ore, 48ore e 72ore. Il ciclo cellulare (C) mostra le percentuali delle tre fasi,  $G_0/G_1$ , S e  $G_2$ , per le quattro linee cellulari. Il ciclo cellulare è stato valutato dopo aver fissato le cellule con etanolo 70% per 24h e con successiva marcatura con ioduro di propidio. La sovrapposizione delle tre curve (D) mostra lo shift verso destra della linea  $TA^{-/-}$ . L'analisi cromosomica (E), è stata eseguita sulle linee in triplicato e i valori corrispondono alla media dei tre replicati.

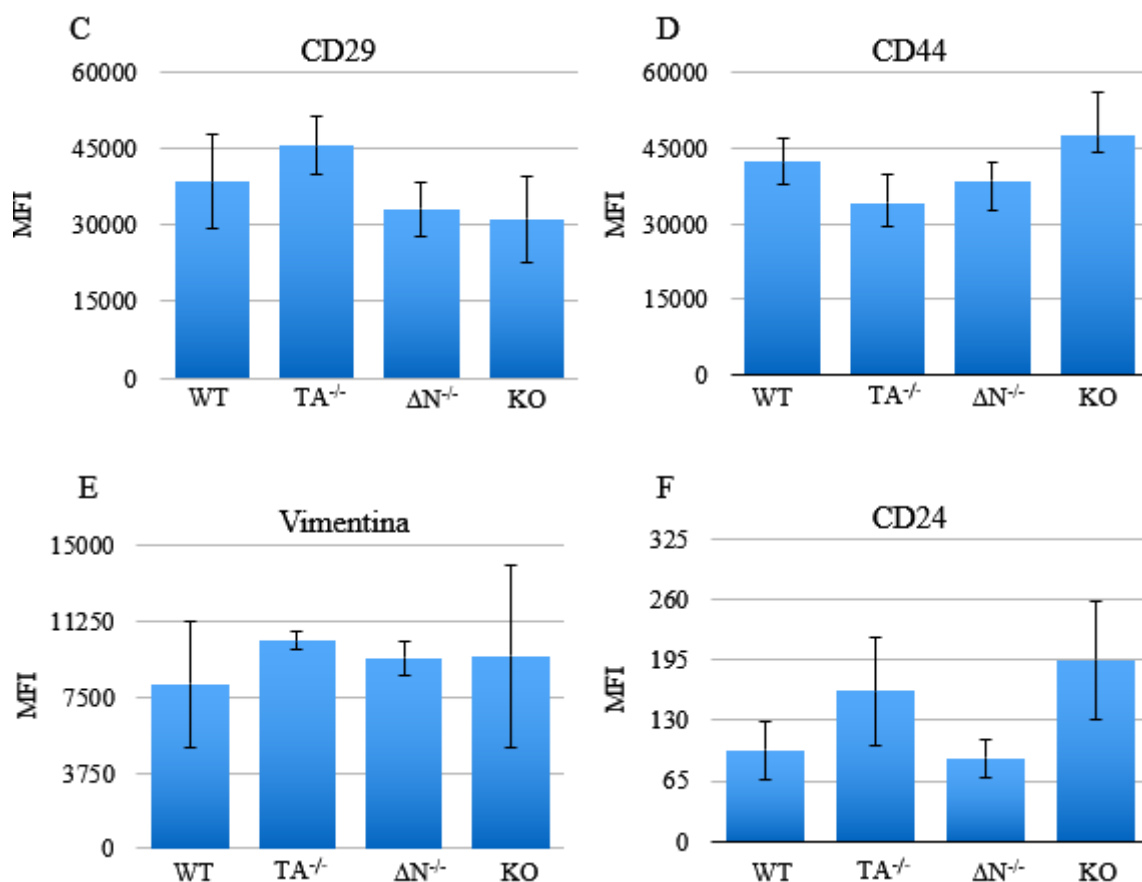
I risultati dell'analisi citofluorimetrica dei principali marcatori tumorali associati alla staminalità nelle BCSCs è schematizzata in figura 8. Nel pannello A sono sintetizzati i livelli di espressione dei marcatori di membrana CD49F, CD44, CD24, vimentina e CD29, per ciascuna linea cellulare.

Come atteso il nostro modello di BCSCs (WT) presenta un quadro di espressione dei marcatori di membrana compatibile con quello di cellule staminali tumorali tipicamente esprimenti alti livelli di CD44 (Fig 8 D) e bassi livelli di CD24 (Fig 8 F), caratterizzate da un fenotipo mesenchimale, con alti livelli di CD49f (Fig 8 B) e Vimentina (Fig 8 E). Tuttavia non è stato possibile evidenziare significative differenze di espressione fra le varie linee, ad indicare che p63 non giochi un ruolo determinante nella regolazione dei marcatori di membrana associati al fenotipo staminale.

A

	WT	TA <sup>-/-</sup>	DN <sup>-/-</sup>	KO
CD29	+++	+++	+++	+++
CD24	+	+	+	+
CD44	+++	+++	+++	+++
CD49f	+++	+++	++	++++
Vimentina	+++	+++	+++	++





**Fig.8:** Marcatori di membrana valutati per caratterizzare le linee cellulari ottenute dal sistema CRISPR-Cas9: TA<sup>-/-</sup>, ΔN<sup>-/-</sup> e KO, confrontate con la linea controllo (WT). Nella tabella riassuntiva (a) sono mostrati i gradi di espressione dei marcatori CD29, CD24, CD44, CD49f e Vimentina, nelle quattro linee dove “+” indica la debole presenza del marcatore, “++” indica una buona presenza del marcatore, “+++” indica una cospicua presenza del marcatore e “++++” indica un’abbondante presenza del marcatore. Sono mostrati inoltre i valori di espressione dei singoli marcatori di membrana valutati in MFI (Mean Fluorescence Intensity) e confrontati tra le varie linee (b, c, d, e, f). Di ogni linea sono state marcate 20000 cellule per ogni condizione con 100μl di anticorpo diluito in BSA 0,5%.

#### 4.2 Effetto in vivo dell’inoculo di BCSCs WT e knock-out per TAp63 o ΔNp63

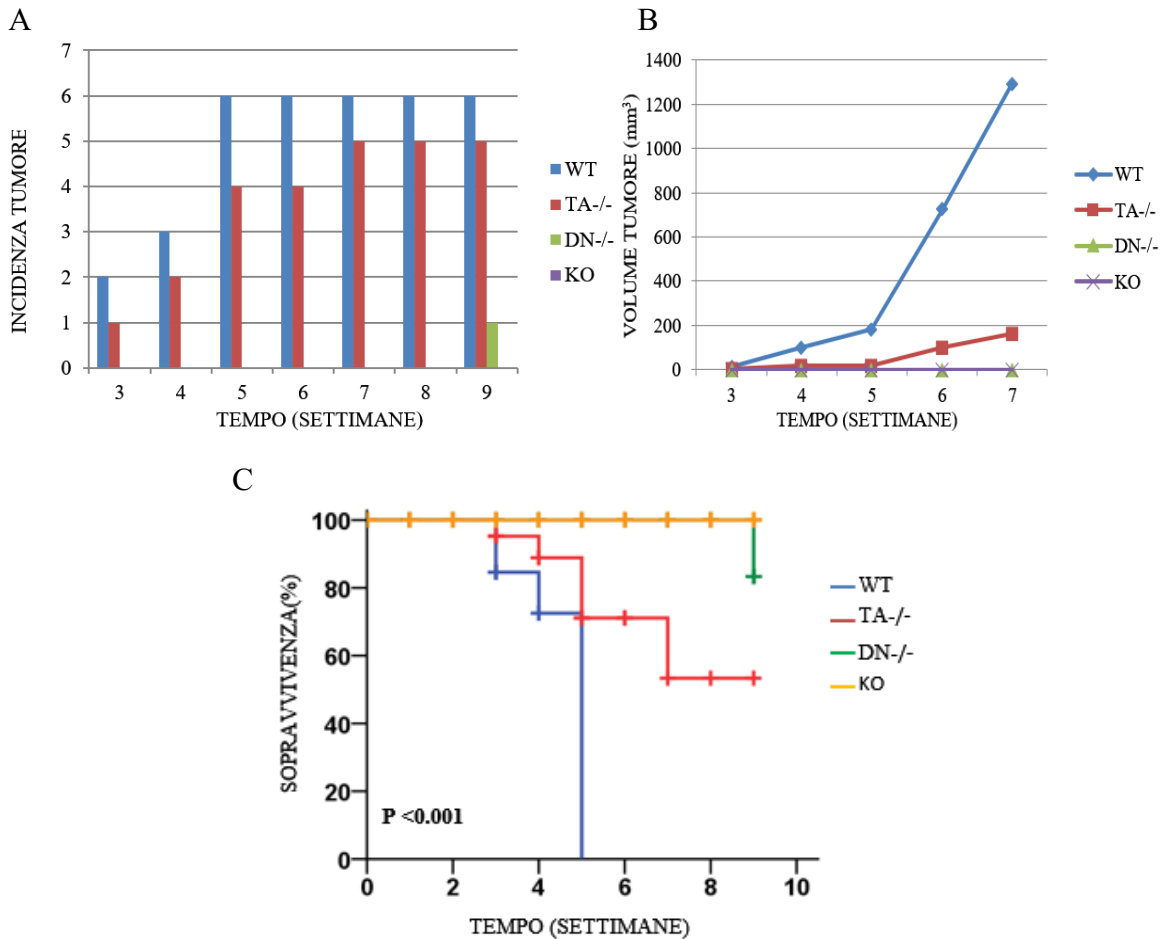
Lecito chiedersi a questo punto se il quadro di espressione dei marcatori di staminalità rispecchi la capacità di generare tumore *in vivo* da parte delle nostre linee. Abbiamo quindi proceduto con l’inoculo sottocute di cellule WT, TA<sup>-/-</sup>, ΔN<sup>-/-</sup> e KO in topi NOD/SCID. La crescita di masse tumorali è stata monitorata

per nove settimane. Come mostra l'istogramma relativo all'incidenza di tumore per ciascuna linea (Fig. 9 A), i primi tumori sono comparsi alla terza settimana e sono derivati dagli inoculi delle linee WT e TA<sup>-/-</sup>; solo alla nona settimana è stato possibile rilevare un unico tumore attribuibile all'inoculo della linea cellulare  $\Delta N^{-/-}$ . La linea KO non ha generato alcun tumore.

Fra gli animali inoculati con le cellule WT e quelli inoculati con la linea TA<sup>-/-</sup>, non è stata riscontrata una significativa differenza nell'incidenza quanto piuttosto nel tasso di incidenza, dato che tutti gli animali del gruppo di controllo (WT) hanno sviluppato tumori già a 5 settimane (Fig.9 A, C).

Andando invece a valutare i volumi medi dei tumori generati (Fig.9 B) è stato possibile rilevare una significativa differenza nella dimensione delle masse tumorali, con tumori di 1200 mm<sup>3</sup> a nove settimane dall'inoculo, per gli animali appartenenti al gruppo WT, contro tumori di soli 200 mm<sup>3</sup> per gli animali appartenenti al gruppo TA<sup>-/-</sup>. I risultati dello xenotrapianto hanno di fatto evidenziato una profonda differenza fra le linee, sia nella potenzialità di indurre tumore che nella velocità di accrescimento del tumore stesso. P63 risulta essere un regolatore fondamentale della staminalità, infatti la sua delezione totale si traduce nell'incapacità delle cellule KO di formare tumori. Lo stesso fenotipo caratterizza le cellule  $\Delta N^{-/-}$ , suggerendo che l'isoforma che sostiene la staminalità sia  $\Delta Np63$ . L'isoforma TAp63 invece è probabilmente coinvolta nella rapidità di accrescimento della massa tumorale; infatti la sua delezione

nelle TA<sup>-/-</sup> non riduce la potenzialità delle cellule di generare tumore ma produce tumori di volume molto inferiore rispetto al controllo.



**Fig. 9:** Sono stati inoculati sei topi NOD/SCID per ogni linea, 50000 cellule per inoculo, effettuato in maniera sottocutanea e sul fianco destro di ogni topo. L'istogramma dell'incidenza della crescita dei tumori (A) mostra la percentuale di crescita dei tumori in base al numero di tumori comparsi dalla terza alla nona settimana. Le barre colorate si riferiscono alle singole le linee: WT (in blu), TA<sup>-/-</sup> (in rosso),  $\Delta$ N<sup>-/-</sup> (in verde) e infine KO (in viola, coperta da  $\Delta$ N<sup>-/-</sup>). Il grafico della crescita tumorale (B) mostra la media dei volumi dei tumori comparsi e misurati alla terza, quarta, quinta, sesta e settima settimana, in particolare vediamo in blu l'andamento della crescita tumorale del gruppo WT, in rosso quello del gruppo TA<sup>-/-</sup>, in verde quello del gruppo  $\Delta$ N<sup>-/-</sup> e in viola quello del gruppo KO. La Kaplan Meier (C) mostra la percentuale di sopravvivenza valutata dalla prima alla nona settimana, calcolata in base al numero di topi sacrificati settimana per settimana. Il sacrificio è avvenuto al raggiungimento da parte del tumore di un volume di circa 1500mm<sup>3</sup>. I tumori prodotti dalla linea WT (in blu), della linea TA<sup>-/-</sup> (in rosso), della linea  $\Delta$ N<sup>-/-</sup> (in verde) e della linea KO (in giallo, coperta da  $\Delta$ N<sup>-/-</sup>) con un valore di P<0.001.

## Capitolo V

### DISCUSSIONE

Uno degli aspetti chiave della trasformazione tumorale è la deregolazione dei meccanismi molecolari che disciplinano i processi di auto-rigenerazione nelle cellule staminali, come anche quelli che governano la riattivazione in cellule più differenziate di vie di segnale tipiche delle cellule staminali. Le CSCs infatti, condividono con le SCs vari pathways normalmente inattivi nelle cellule differenziate, che sarebbero responsabili della riacquisizione della potenzialità di autorigenerarsi, di sostenere la crescita tumorale e la diffusione metastatica (Clarke MF et al., 2006).

In aggiunta alla osservazione preliminare dell'alterazione dell'epidermide e derivati nel modello animale con delezione totale della proteina p63, molte ormai sono le evidenze che collegano la proteina p63 al mantenimento della staminalità nei tessuti di derivazione ectodermica (Yang et al., 1999; Mills et al., 1999; Li et al., 2008; Yalcin-Ozuyal et al., 2010; Chakrabarti et al., 2014). Resta meno chiaro invece il coinvolgimento di p63 nella carcinogenesi e nell'acquisizione e mantenimento del fenotipo staminale in CSCs. In analogia con p53, p63 è stato in un primo momento considerato un gene oncosoppressore. Questa ipotesi però ha perso consistenza con la constatazione di un basso tasso di mutazione del gene nei tumori (Osada et al., 1998; Hibi et al., 2000). Piuttosto, p63 sembra essere sovra-espresso in vari tipi di tumore, ricoprendo



un potenziale ruolo di oncogene (Di Como et al., 2002; Au et al., 2004). La variante  $\Delta Np63$  risulta over-espressa nel carcinoma mammario del tipo Basal-like (Ribeiro-Silva et al., 2003; Hoadley et al., 2014), sottotipo per il quale è stato ipotizzato un ruolo centrale di  $\Delta Np63$  nella regolazione delle BCSCs (Chakrabarti R. et al., 2014). In carcinomi dalla componente cellulare più differenziata, come il sottotipo Luminal-like, l'espressione di  $\Delta Np63$  è invece ridotta durante la progressione tumorale (Barbareschi et al., 2001).

Di fatto gli autori sono in disaccordo: alcuni sostengono che p63 sia un oncogene, altri che sia un onco-soppressore (Flores et al. 2005; Mills et al., 2016). Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nella complessità delle isoforme proteiche generate dal gene p63 a causa delle varianti ammino-terminali probabilmente impegnate in ruoli antagonisti. Inoltre non possiamo escludere che tali varianti assumano funzioni diverse nell'eterogenea varietà di popolazioni neoplastiche che compongono il tumore, di cui le CSCs potrebbero costituire una piccola frazione in una massa tumorale di cellule più differenziate.

In questa cornice si inquadra il nostro lavoro di ricerca. La delezione selettiva delle varianti ammino-terminali di p63 ci ha permesso di identificare in maniera chiara l'isoforma  $\Delta N$  come essenziale nel mantenimento della staminalità della BCSCs.

Infatti, le cellule knock-out, così come quelle esprimenti esclusivamente l'isoforma TA, risultano incapaci di generare tumore in xenotrapianto, mentre le cellule esprimenti unicamente l'isoforma  $\Delta N$  conservano il potenziale tumorigenico delle BCSCs di controllo, corredate di entrambe le isoforme. D'altronde, già i risultati pregressi degli esperimenti preliminari di over-espressione delle due varianti ammino-terminali in BCSCs WT mostravano un potenziamento dell'attività tumorigenica da parte dell'isoforma  $\Delta N$ .

L'isoforma TA invece, sembrava conferire alle cellule un fenotipo maggiormente differenziato. Dati di letteratura mostrano come la sua over-espressione sia infatti associata a diminuzione dei livelli della cheratina 5 ed aumento della cheratina 8. Citocheratine 5 ed 8 appartengono a due gruppi di cheratine espresse rispettivamente nel compartimento basale ed in quello luminale dell'epitelio della ghiandola mammaria. Mentre le cheratine luminali sono tipici marcatori del carcinoma mammario, quelle basali sono scarsamente espresse con eccezione del sottotipo basal-like, carcinoma poco differenziato e molto aggressivo (Taylor-Papadimitriou et al., 1989). Pertanto il quadro di espressione indotto da TAp63 sembrerebbe spingere le cellule verso un fenotipo più luminale e di conseguenza più differenziato. Questo peraltro rispecchierebbe quanto fisiologicamente avviene nell'epitelio della ghiandola mammaria dove la popolazione staminale e le sottopopolazioni di progenitori mostrano un distinto quadro di espressione delle varianti aminoterminali di

p63, con l'isoforma  $\Delta N$  presente nelle cellule staminali e l'isoforma TA nei progenitori (Li et al., 2008). Sembra anzi che l'espressione dell'isoforma  $\Delta N$  debba essere spenta per consentire alla cellula staminale di uscire dallo stato di quiescenza ed entrare nel programma di proliferazione e differenziamento che sarebbe guidato dall'isoforma TA. In linea con questo modello, i nostri risultati mostrano che la delezione dell'isoforma TA (linea TA<sup>-/-</sup> e KO) conferisce uno svantaggio proliferativo alle BCSCs in vitro, che, pur essendo ancora in grado di generare tumore, supportano uno sviluppo ridotto della massa tumorale rispetto alle BCSCs WT.

Nel complesso i nostri risultati sostengono un ruolo fondamentale di p63 nella patogenesi del carcinoma mammario e individuano nella isoforma  $\Delta N$ p63 la variante che regola i processi di staminalità e nella isoforma TAp63 la variante che supporta la propagazione delle popolazioni più differenziate all'interno della massa tumorale.

A questo punto, la questione aperta è stabilire se e come il rapporto relativo delle due isoforme di p63 possa giocare un ruolo cruciale nel mantenimento di un equilibrio tra la quota di cellule staminali e cellule progenitrici/differenziate nell'eterogeneità cellulare che caratterizza i tumori.

## Capitolo VI

### CONCLUSIONI

Lo scopo del lavoro svolto in questa tesi era studiare il ruolo delle diverse isoforme di p63 nello sviluppo tumorale ed in particolare il ruolo nel mantenimento di un fenotipo staminale. Per raggiungere questo scopo abbiamo utilizzato come modello una linea primaria di carcinoma della mammella in cui abbiamo generato cloni in cui le due principali isoforme sono state delete alternativamente mediante la tecnica CRISPR-Cas9. Abbiamo quindi valutato: le caratteristiche fenotipiche delle cellule; le loro capacità proliferative in vitro e la capacità di formare tumori in vivo. L'osservazione di maggior rilievo è stata ottenuta dagli esperimenti in vivo, dai quali è emerso che l'isoforma  $\Delta N$  è essenziale per il mantenimento di un fenotipo staminale delle cellule tumorali. Le cellule private selettivamente di tale isoforma, pur esprimendo l'isoforma TA, risultano incapaci di formare tumori in vivo. Tale evidenza rende l'isoforma  $\Delta N$  responsabile dell'innescò dello sviluppo del tumore in vivo, dimostrando una maggiore capacità clonogenica.

## BIBLIOGRAFIA

Al Bakir Maise and Hani Gabra. "The molecular genetics of hereditary and sporadic ovarian cancer: implications for the future". *Br Med Bull.* 2014 Dec;112(1):57-69.

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

Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, Perou CM, Sherman ME "How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more?". *J Natl Cancer Inst.*, 2014; 106(8).

Antoniou P, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hooper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, et al. "Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA 1 or BRCA 2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A combined Analysis of 22 studies". *American Journal of Human Genetics*, 2003; 72: 1117-1130

Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG, Macrì E, Rizzo A, Viale G, Doglioni C. "p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast". *Am J Surg Pathol*, 2001 25(8): 1054-60.

Bergholz J, Xiao ZX. "Role of p63 in Development, Tumorigenesis and Cancer Progression". *Cancer Microenviron.* 2012 Dec;5(3):311-22.

Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, et al. "Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies". *PLoS Med.*, 2010; 7(5): e1000279

Bonnet D, Dick JE. "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell". *Nature Medicine*, 1997; 3(7): 730-737.

Bouras T, Pal B, Vaillant F, Harburg G, Asselin-Labat ML, Oakes SR, Lindeman GJ, Visvader JE "Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment". *Cell Stem Cell*, 2008; 3: 429-441.

Campbell LL, Polyak K. "Breast tumor heterogeneity. Cancer stem cells or clonal evolution?". *Cell Cycle* 2007, 6:2332,

Carnero, Amancio & Lleonart, Matilde "The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution". *Bioessays*. 2016 Jul;38 Suppl 1:S65-74.

Celli J, Duijf P, Hamel B et al. "Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome". *Cell*, 1999; 99: 143-153

Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, Brooks M, Reinhardt F, Su Y, Polyak K, Arendt LM, Kuperwasser C, Bierie B, Weinberg RA. "Normal and neoplastic non stem cells can spontaneously convert to a stem-like state". *Proc. Natl Acad Sci*, 2011; 108: 7950-7955.

Chakrabarti R, et al. "ΔNp63 promotes stem cell activity in mammary gland development and basal-like breast cancer by enhancing Fzd7 expression and Wnt signaling". *Nat Cell Biol*, 2014; 16(10): 1004-1015.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. "Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature". *Cancer Res*, 2009; 69: 1302-1313.

Chen X. "The p53 family: same response, different signals?" *Mol. Med.*, 1999; 5: 387-392.

Cho SW et al. "Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease". *Nat Biotechnol*, 2013 31: 230-232.

Chen Y, Peng Y, Fan S, Li Y, Xiao ZX, Li C. "A double dealing tale of p63: an oncogene or a tumor suppressor" *Cell Mol Life Sci*. 2018 Mar;75(6):965-973.

Clarke MF, Fuller M. "Stem cells and cancer: two faces of eve". *Cell*, 2006; 124(6): 1111-1115.

Coates PJ, Nenutil R, Holcakova J, Nekulova M, Podhorec J, Svoboda M, Vojtesek B. p63 isoforms in triple-negative breast cancer: ΔNp63 associates with the basal phenotype whereas TAp63 associates with androgen receptor, lack of BRCA mutation, PTEN and improved survival. *Virchows Arch*. 2018 Mar;472(3):351-359.

Dean M, Foyo T, Bates S. "Tumor stem cells and drug resistance". *Nature Reviews/Cancer*, 2005; 5: 275-284.

Di Como CJ1, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, Pohar K, Hoos A, Cordon-Cardo C. "P63 expression profiles in human normal and tumor tissues". *Clin Cancer Res*, 2002; 8(2): 494-501.

Di Renzo J, Signoretti S, Nakamura N, Rivera-Gonzalez R, Sellers W, Loda M, Brown M. "Growth Factor Requirements and Basal Phenotype of an Immortalized Mammary Epithelial Cell Line1". *Cancer Research*, 2002; 62: 89-98.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Michael FC, Kawamura MJ, Wicha MS. "In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells". *Genes & Development*, 2003; 17: 1253-1270.

Du Z, Li J, Wang L, Bian C, Wang Q, Liao L, Dou X, Bian X, Zhao RC. "Overexpression of ΔNp63α induces a stem cell phenotype in MCF7 breast carcinoma cell line through the Notch pathway". *Cancer Sci*, 2010; 101: 2417-2424.

Elshamy WM, Duhé “Overview: cellular plasticity, cancer stem cells and metastasis”. *RJ Cancer Lett*, 2013; 341(1): 2-8.

Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D, Yang A, McKeon F, Jacks T. “Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: Evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family”. *Cancer Cell*, 2005 Apr;7(4):363-73.

Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, Jacks T. “p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage”. *Nature*, 2002; 416: 560-564.

Gatti V, Bongiorno-Borbone L, Fierro C, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Peschiaroli A. “p63 at the Crossroads between Stemness and Metastasis in Breast Cancer”. *Int J Mol Sci*. 2019 May 31;20(11).

Ghioni P, Bolognese F, Duijf PH, Van Bokhoven H, Mantovani R, Guerrini L. “Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains” *Mol. Cell Biol.*, 2002; 22: 8659-8668.

Gunther EJ, Moody SE, Belka GK, Hahn KT, Innocent N, Dugan KD, Cardiff RD, Chodosh LA. “Impact of p53 loss on reversal and recurrence of conditional Wnt-induced tumorigenesis”. *Genes Dev.*, 2003; 17(4): 488-501.

Guo X, Keyes WM, Papazoglu C, Zuber J, Li W, Lowe SW, Vogel H, Mills AA. “TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo”. *Nat Cell Biol*. 2009 Dec;11(12):1451-7.

Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, Lander ES. “Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells”. *Cell*, 2011; 146: 633-644.

Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES: “Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening”. *Cell*, 2009; 138: 645-659.

Han J, Hendzel MJ, Allalunis-Turner J. “Notch signaling as a therapeutic target for breast cancer treatment?”. *Breast Cancer Res*, 2011; 13: 210.

Hahn WC, Weinberg RA. “Rules for making human tumor cells”. *N Engl J Med* 347:1593, 2002.

Hanahan D, Weinberg RA. “The hallmarks of cancer”. *Cell* 100:57, 2000

Heppner GH. “Tumor Heterogeneity”. *Cancer Res*, 1984; 44: 2259-2265.

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): 313-323.

Juwle A, Saranath D. “BRCA1/BRCA2 gene mutations/SNP and BRCA1 haplotypes in early-onset breast cancer patients of Indian ethnicity”. *Med Oncol.* 2012 Dec;29(5):3272-81

Kent S, Hutchinson J, Balboni A, Decastro A, Cherukuri P, Drenzo J. “ $\Delta Np63\alpha$  promotes cellular quiescence via induction and activation of Notch3”. *Cell Cycle.* 2011 Sep 15;10(18):3111-8.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA “Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies”. *J Clin Invest.* 2011 Jul;121(7):2750-67

Leong CO, Vidnovic N, DeYoung MP, Sgroi D, Ellisen LW. “The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers”. *J Clin Invest.*, 2007; 117(5): 1370-80.

Levine AJ, Oren M. “The first 30 years of p53: growing ever more complex”. *Nat Rev Cancer.* 2009 Oct;9(10):749-58.

Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. “Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy”. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100: 672-679.

Luo M, Clouthier SG, Deol Y, Liu S, Nagrath S, Azizi E, Wicha MS. “Breast cancer stem cells: current advances and clinical implications”. *Methods Mol Biol.* 2015;1293:1-49.

May P, May E. “Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein”. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7621-36.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. “The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.” *Cell.* 2008; 133: 704-715.

Murphy, C. G., & Moynahan, M. E. (2010). “BRCA Gene Structure and Function in Tumor Suppression.” *The Cancer Journal*, 16(1), 39–47

Massion PP, Taflan PM, Jamshedur Rahman SM, Yildiz P, Shyr Y, Edgerton ME, Westfall MD, Roberts JR, Pietenpol JA, Carbone DP, Gonzalez AL. “Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis”. *Cancer Res.* 2003 Nov 1;63(21):7113-21.

Melino G. “p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53”. *Cell Death Differ.* 2011; 18 (9): 1487-1499.

Melino G, Memmi EM, Pelicci PG, Bernassola F. “Maintaining epithelial stemness with p63”. *Sci Signal.* 2015 Jul 28;8(387):re9.



Meyer MJ, Fleming JM, Ali MA, Pesesky MW, Ginsburg E, Vonderhaar BK. "Dynamic regulation of CD24 and the invasive, CD44posCD24neg phenotype in breast cancer cell lines". *Breast Cancer Res*, 2009; 11: R82.

Mills AA. "p63: oncogene or tumor suppressor? *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Feb;16(1):38-44

Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogelk H, Roop DR, Bradley A. "p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis". *Nature* 1999; 398(22).

Nassar D, Blanpain C. "Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications". *Annu Rev Pathol*. 2016 May 23;11:47-76

Nekulova M, Holcakova J, Coates P, Vojtesek B. "The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells". *Cell Mol Biol Lett*, 2011; 16(2): 296-327.

Nylander K, Coates PJ, Hall PA. "Characterization of the expression pattern of p63 alpha and delta Np63 alpha in benign and malignant oral epithelial lesions". *Int J Cancer*, 2000; 87(3): 368-72.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. "A human colon cancer cell capable of initiating tumor growth in immunodeficient mice". *Nature*, 2007; 445: 106-110.

Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M, Ikawa S. "Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53". *Cellular & Molecular Biology Letters* 319. *Nat Med*, 1998; 4: 839-843 .

Palma M, Ristori E, Ricevuto E, Giannini G, Gulino A. "BRCA1 and BRCA2: the genetic testing and the current management options for mutation carriers". *Oncology/Hematology*, 2006; 57(1): 1-23.

Page DL, et al. "Continued local recurrence of carcinoma 15-25 years after a diagnosis of low grade ductal carcinoma in situ of the breast treated only by biopsy." *Cancer* 76:1197, 1995.

Parise CA, Caggiano V. "Breast Cancer Survival Defined by the ER/ PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers". *J Cancer Epidemiol*, 2014; 2014: 469251.

Perou CM, Borresen-Dale AL. "Systems biology and genomics of breast cancer". *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2011

Polakis P. "Wnt signalling and cancer". *Genes Dev*, 2000; 14: 1893-1851.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE “Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma”. *Proc Natl Acad*, 2007; 104(3): 973-978.

Qiu M, Peng Q, Jiang I, Carroll C, Han G, et al. “Specific inhibition of Notch1 signaling enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in triple negative breast cancer through reduction of cancer stem cells”. *Cancer Lett*, 2013; 328: 261-270.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. “Stem cell, cancer and cancer stem cells”. *Nature*, 2001; 414: 105-111.

Ribeiro-Silva A, Zambelli Ramalho LN, Britto Garcia S, Zucoloto S. “The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue”. *Arch Pathol Lab Med*, 2003; 127(3): 336-340

Rocco JW, Ellisen LW. “p63 and p73: life and death in squamous cell carcinoma”. *Cell Cycle*. 2006 May;5(9):936-40.

Schultz J, Ponting CP, Hofmann K, Bork P. “SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation”. *Protein Sci.*, 1997; 6: 249-253.

Serber Z, Lai HC, Yang A, et al. “A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by an intramolecular mechanism”. *Mol. Cell Biol.*, 2002, 22: 8601-8611.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. “Identification of human brain tumour initiating cell”. *Nature*, 2004; 432: 396-401.

Smalley M, Piggott L, Clarkson R. “Breast cancer stem cells: Obstacles to therapy”. *Cancer Lett*, 2012.

Stefanou D, Batistatou A, Nonni A, Arkoumani E, Agnantis NJ. “p63 expression in benign and malignant breast lesions”. *Histol Histopathol*, 2004; 19(2): 465-71.

Stingl J, Caldas C. “Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis”. *Nat Rev Cancer* 10:791, 2007.

Su X, Flores ER. “TAp63: The fountain of youth”. *Aging (Albany NY)*. 2009 Oct 21;1(10):866-9.

Su X, Chakravarti D, Cho MS, Liu L, Gi YJ, Lin YL, Leung ML, El-Naggar A, Creighton CJ, Suraokar MB, Wistuba I, Flores ER. “TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs”. *Nature*. 2010 Oct 21;467(7318):986-90.

Taylor-Papadimitriou J, Stampfer M, Bartek J, Lewis A, Boshell M, Lane EB, Leigh IM. "Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium". *J Cell Sci*, 1989; 94(3): 403-13.

Terns RM, Terns MP. "CRISPR-based technologies: prokaryotic defense weapons repurposed". *Trends Genet*, 2014; 30(3): 111-118.

Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro A, Tan B, Tan P, Tan PH. "Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer". *Modern Pathology*, 2010; 23: 123-133.

Van den Broek AJ, Schmidt MK, van 't Veer LJ, Tollenaar RAEM, van Leeuwen FE "Worse Breast Cancer Prognosis of BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers: What's the Evidence? A Systematic Review with Meta-Analysis". *PLoS One*. 2015 Mar 27;10(3):e0120189

Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M, Beck B, Bouvencourt G, Rock J, Sharma N, Dekoninck S, Blanpain C. "Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance". *Nature*, 2011; 479: 189-193.

Venkitaraman Ashok R. "Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2". *Cell Press*, 2002; 108(2): 171-182.

Visvader JE. "Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis". *Genes Dev*, 2009; 23: 2563-2577

Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA. "The DNp63a phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3s promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations". *Mol. Cell Biol.*, 2003; 23: 2264-2276.

Westfall MD, Pietenpol JA. "p63: molecular complexity in development and cancer". *Carcinogenesis*, 2004; 25(6): 857-864.

Yalcin-Ozuysal O, et al. "Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates". *Cell Death Differ*, 2010; 17(10): 1600-1612.

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillet E, Fleming M, Dotsch V, Andrews N, Caput D, McKeon F. "p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing and dominant-negative activities". *Mol. Cell.*, 1998; 2: 305-316.

Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronsonk RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. "p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development". *Nature*, 1999; 398(22).

Yang F, Xu J, Tang L, Guan X. “Breast cancer stem cell: the roles and therapeutic implications”. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Mar;74(6):951-966.

You L, et al. “An anti-Wnt-2 monoclonal antibody induces apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth”. *Cancer Res.*, 2004; 64: 5385–5389.

Zucchia S, Astigianob G, Sanzonea S, Cocolaa C, Pelucchia P, Bertolia G, Stehlingd M, et al. “Distinct populations of tumor-initiating cells derived from a tumor generated by rat mammary cancer stem cells”. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 2008; 105 (44): 16940-16945.