

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

IRCCS Ospedale San Raffaele, unità di Genomica funzionale del cancro

Studio dell'eterogeneità e della plasticità intratumorale nei modelli di carcinoma mammario triplo negativo SUM149 e MDA-MB-468

Relatore:
Prof. Comincini Sergio

Correlatore:
Dr. Tonon Giovanni

Tesi Sperimentale
di *Ferro Fabiana*

Anno Accademico 2024/2025

RIASSUNTO

I tumori umani mostrano una sorprendente eterogeneità sia morfologica che fisiologica nota come eterogeneità intratumorale (ITH), che rappresenta una delle principali sfide nella comprensione della biologia del cancro e nello sviluppo di terapie efficaci. I tumori mostrano una sostanziale eterogeneità in quasi tutte le caratteristiche fenotipiche distinguibili, come la morfologia cellulare, l'espressione genica (inclusa l'espressione dei marcatori di superficie cellulare e dei recettori dei fattori di crescita), il metabolismo, la motilità e il potenziale proliferativo, immunogenico e metastatico [1].

Negli ultimi anni, particolare attenzione è stata rivolta al concetto di plasticità cellulare, ovvero la capacità delle cellule tumorali di adattarsi a condizioni ambientali sfavorevoli attraverso il passaggio dinamico tra stati fenotipici differenti. Questo fenomeno, osservabile anche in assenza di mutazioni genetiche stabili, è cruciale nella progressione tumorale, nella metastatizzazione e nella resistenza ai trattamenti farmacologici.

Uno dei meccanismi molecolari alla base della plasticità tumorale è un processo noto come EMT (transizione epitelio-mesenchimale), un processo biologico attraverso il quale le cellule epiteliali perdono le loro caratteristiche polarizzate e aderenti, acquisendo proprietà mesenchimali, migratorie e invasive. L'EMT non è un evento binario, ma piuttosto uno spettro continuo in cui le cellule possono trovarsi in stati ibridi o transitori. Questa natura dinamica e reversibile dell'EMT contribuisce in maniera sostanziale alla flessibilità fenotipica delle cellule neoplastiche [2].

Le assunzioni che hanno gettato le basi per gli esperimenti da me fatti sono originate da osservazioni antecedenti il mio arrivo, sulla linea cellulare di carcinoma mammario triplo negative (SUM149); cellule caratterizzate da un'alta capacità invasiva e migratoria. A differenza di molte altre cellule derivate da tumore al seno queste cellule continuano a esprimere il marcatore epiteliale E-caderina, spesso persa nella transizione epitelio-mesenchimale. Nello specifico, pur esprimendo marcatori epiteliali, le SUM 149 mostrano una grande plasticità fenotipica, come risulta dall'utilizzo del marcatore di superficie EPCAM, arrivando in certi momenti a esprimere marcatori mesenchimali (come vimentina) e possibilmente suggerendo uno stato ibrido EMT.

Nel contesto del presente progetto sperimentale, condotto durante il mio tirocinio di tesi magistrale, ho indagato sulla plasticità fenotipica di diverse linee cellulari di carcinoma mammario (SUM149; MCF7), allo scopo di testare l'effetto di diversi trattamenti farmacologici sulla modulazione dello stato fenotipico. I trattamenti sono stati selezionati in base alla loro potenziale capacità di interferire con i processi associati alla plasticità cellulare e nell'EMT (transizione epitelio-mesenchimale). In particolare, prendendo come punto di partenza il concetto di plasticità cellulare e analizzando il cambiamento fenotipo tra le sub-popolazioni cellulari di più linee di cancro al seno, il mio progetto si è poi focalizzato, come obiettivo principale di studio, su una linea di carcinoma mammario triplo negativo (TNBC), ovvero la linea cellulare MDA-MB-468, una delle più studiate per le sue caratteristiche aggressive e la sua elevata capacità plastica. L'obiettivo principale è stato quello di dimostrare sperimentalmente la presenza di una continua transizione tra stati fenotipici, presumibilmente regolata dall'attivazione di programmi molecolari riconducibili all'EMT. Questo lavoro si inserisce in un più ampio contesto di ricerca volto a comprendere meglio le basi molecolari dell'adattamento tumorale, con l'obiettivo di identificare nuovi bersagli terapeutici capaci di limitare la capacità delle cellule tumorali di evadere l'efficacia delle terapie convenzionali.

INDICE

1. INTRODUZIONE 7

1.1. ETEROGENEITÀ TUMORALE 7

1.1.1. ETEROGENEITÀ GENETICA 9

1.1.2. ETEROGENEITÀ NON-GENETICA 13

1.1.3. ETEROGENEITÀ DEL MICROAMBIENTE TUMORALE 16

1.1.4. ETEROGENEITÀ E RESISTENZA AI FARMACI 17

1.2. PLASTICITÀ CELLULARE 18

1.2.1. PLASTICITÀ DURANTE LO SVILUPPO E LA RIGENERAZIONE TISSUTALE 19

1.2.2. TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE (EMT) 20

1.2.3. PLASTICITÀ EPIGENETICA E STATI CELLULARI DEL CANCRO 23

1.3. CARCINOMA ALLA MAMMELLA 23

1.3.1. MODELLI DI TRANSIZIONE STOCASTICA DEGLI STATI CELLULARI NEL CARCINOMA ALLA MAMMELLA 25

2. MATERIALI E METODI 29

2.1. COLTURE CELLULARI 29

2.2. CITOMETRIA A FLUSSO 29

2.3. IMMUNOFLUORESCENZA 29

2.4. ANALISI DI IMAGING 30

2.5. ESTRAZIONE RNA E PCR QUANTITATIVA REAL-TIME 31

2.6. GENERAZIONE DELLA LINEA CELLULARE REPORTER SUM149 32

2.7. SENSIBILITÀ CELLULARE AL TRATTAMENTO FARMACOLOGICO 32

2.8. INFEZIONE LENTIVIRALE 33

3. RISULTATI 34

3.1. DEFINIZIONE DI PLASTICITÀ E DINAMICITÀ DEGLI STATI CELLULARI NELLA LINEA DI CANCRO AL SENO SUM149 34

3.1.1. LA LINEA DI CANCRO AL SENO SUM149 È CARATTERIZZATA DALLA CO-ESISTENZA DI DIFFERENTI STATI CELLULARI 34

3.1.2. LE SOTTOPOPOLAZIONI DELLA LINEA CELLULARI SUM149 RISTABILIZZA CON IL PASSARE DEL TEMPO L'INIZIALE EQUILIBRIO FENOTIPICO DELLA LINEA PARENTALE 37

3.2. LE SOTTOPOPOLAZIONI DELLE LINEE CELLULARI DI CANCRO AL SENO POSSONO ESSERE STIMOLATE A SPOSTARSI TRA DI LORO.....41

3.2.1. GENERAZIONE DEI REPORTER PER LA LINEA CELLULARE SUM149.41

3.2.2. TEST FARMACOLOGICO DI FATTORI INDUTTORI DELL'EMT SULLE LINEE CELLULARI SUM149 E MCF7.....43

3.3. DEFINIZIONE DI PLASTICITÀ E DINAMICITÀ DEGLI STATI CELLULARI IN ALTRE LINEE DI CANCRO AL SENO, L'ETEROGENEITÀ CELLULARE È UNA CARATTERISTICA COMUNE TRA LE LINEE DI CANCRO AL SENO 56

3.3.1. CARATTERIZZAZIONE DELL'ETEROGENEITÀ FENOTIPICA DELLE LINEE CELLULARI DI CANCRO AL SENO MDA-MB-436; HCC-1937 E MAD-MB-468 CON IDENTIFICAZIONE DI ETEROGENEITÀ FENOTIPICA NELLA LINEA CELLULARE MDA-MB-468 AL MARCATORE DI SUPERFICIE CD56 (NCAM) 56

3.4. LE SOTTOPOPOLAZIONI DELLE MDA-MB-468 RITORNANO CON IL TEMPO A RISTABILIRE UN EQUILIBRIO FENOTIPICO CORRISPONDETE A QUELLO DELLA POPOLAZIONE PARENTALE 62

3.4.1. RILEVAZIONE TRAMITE ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA DI DIFFERENZE SOSTANZIALI NELLE SOTTOPOPOLAZIONI SEPARATE A PARTIRE DELLA LINEA CELLULARE PARENTALE MDA-MB-468 67

3.4.2. IDENTIFICAZIONE DI UNA POPOLAZIONE IBRIDA CON NON NETTA DISTINZIONE TRA LE DUE SOTTOPOPOLAZIONI TRAMITE ANALISI AL MICROSCOPIO CONFOCALE 70

4. DISCUSSIONE 72

5. BIBLIOGRAFIA 78

1. Introduzione

1.1. Eterogeneità tumorale

L'eterogeneità tumorale è un concetto centrale nell'oncologia contemporanea, che descrive la diversità molecolare, genetica, cellulare e fenotipica che può esistere tra diversi tumori o all'interno dello stesso tumore, fenomeno noto come ITH (intratumor heterogeneity/eterogeneità intratumorale). Questa complessità rappresenta una delle maggiori sfide nella diagnosi, prognosi e trattamento del cancro e deriva da differenze genetiche e non, che interessano tutti gli aspetti del fenotipo tumorale, inclusi proliferazione, tumorigenicità, metastatizzazione e resistenza ai trattamenti farmacologici[3]; motivi per i quali la comprensione della natura dinamica e multifattoriale dell'eterogeneità tumorale è cruciale per lo sviluppo di strategie terapeutiche.

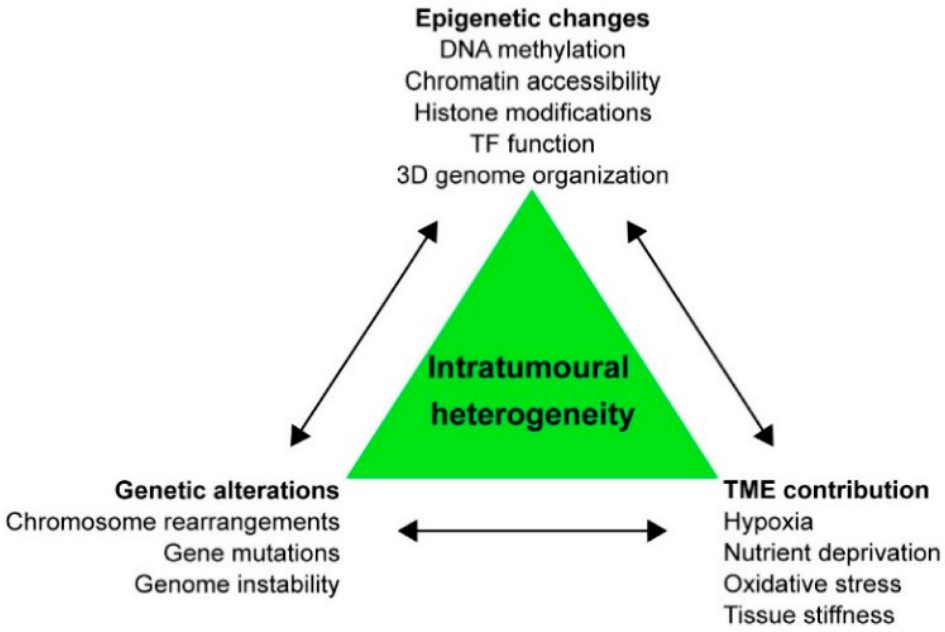


***Figura 1**. Schema riassuntivo dei diversi fattori che guidano l'eterogeneità intratumorale (ITH) e della loro interconnessione. (Beyes et al, 2021)*

Dal punto di vista clinico, essa è alla base della variabilità nella risposta ai trattamenti oncologici. Pazienti affetti dallo stesso tipo di tumore, persino allo stesso stadio, possono

rispondere in modo radicalmente differente a terapie identiche, proprio a causa delle profonde differenze nei profili genetici e fenotipici dei loro tumori. In parallelo, anche all'interno di uno stesso tumore possono coesistere sub-popolazioni cellulari con caratteristiche biologiche e comportamentali differenti [3].

L'origine dell'eterogeneità è multifattoriale e include alterazioni genetiche (mutazioni, delezioni, amplificazioni geniche); epigenetiche (metilazione del DNA, modificazioni istoniche), trascrittomiche e proteomiche. Tuttavia, essa non si limita solo alle cellule tumorali ma il microambiente in cui queste crescono (composto da cellule stromali, immunitarie, vasi sanguigni, matrice extracellulare) contribuisce in modo sostanziale a modellare la diversità tumorale [4].

La presenza dell'eterogeneità tumorale ha profonde implicazioni anche per la ricerca oncologica. Per esempio, le analisi su biopsie tumorali potrebbero non essere rappresentative dell'intero tumore, limitando l'accuratezza delle diagnosi molecolari. Inoltre, la selezione clonale indotta dalla pressione terapeutica può favorire l'espansione di sottopopolazioni resistenti, compromettendo l'efficacia dei trattamenti e favorendo le recidive [5].

La mappatura dettagliata delle variazioni genomiche, epigenetiche e trascrizionali tra diversi tumori ha evidenziato l'ampiezza del concetto di eterogeneità, come dimostrato dal progetto The cancer Genome Atlas (TCGA) [6] e da numerosi studi recenti di genomica.

Sottolineando quindi l'importanza della scoperta dell'eterogeneità tumorale e di come questa possa parzialmente o totalmente influire sulla risposta terapeutica, si cerca sempre di più di comprendere i meccanismi che guidano le sottopopolazioni cellulari, verso una continua transizione. L'eterogeneità tumorale, dunque, sottolinea la necessità di un approccio multidimensionale alla gestione del cancro, che consideri non solo le mutazioni genetiche ma anche le caratteristiche dinamiche del microambiente tumorale e la plasticità fenotipica delle cellule neoplastiche.

In questa sezione verrà data una breve panoramica delle principali fonti di ITH intrinseche (che includono eterogeneità genetica e non) ed estrinseche (cioè legate al microambiente tumorale).

1.1.1. Eterogeneità genetica

L'eterogeneità genetica rappresenta uno dei capisaldi della complessità biologica sia nei tumori solidi che nelle neoplasie ematologiche. Essa si riferisce alla presenza, all'interno dello stesso tumore, di popolazioni cellulari geneticamente diverse, che si originano attraverso un processo di evoluzione clonale. Questo fenomeno deriva dall'accumulo graduale di alterazioni genetiche somatiche (mutazioni puntiformi, delezioni, inserzioni, amplificazioni geniche e traslocazioni cromosomiche) che portano alla formazione di un mosaico eterogeneo di sottocloni, ciascuno con caratteristiche molecolari e comportamentali distinte [7].

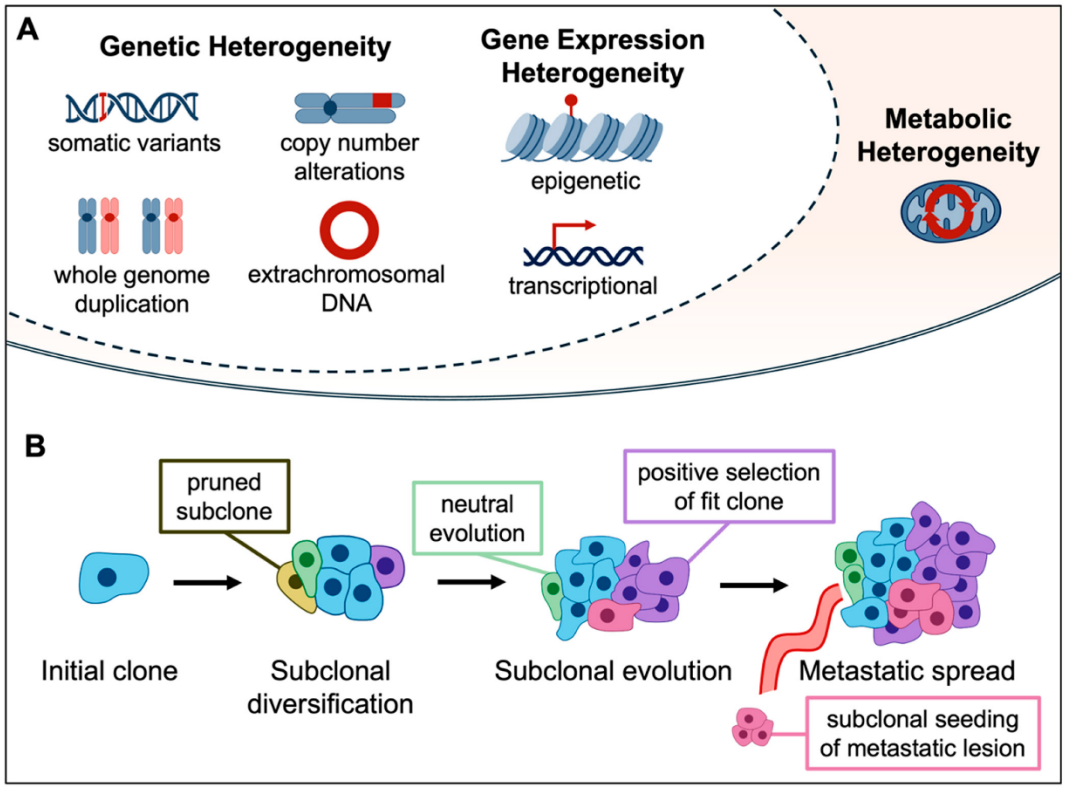


***Figura 2**. Fonte di eterogeneità intrinseca del tumore e evoluzione ramificata con generazione di nuovi sottocloni, in cui si vede la netta selezione dei sottocloni che subiscono una selezione positiva diventando dominanti a svantaggio di altri che subiscono un'evoluzione negativa o neutra. (Woodward et al, 2022)*

Sebbene le DNA polimerasi siano altamente efficienti nella correzione di errori di mutagenesi, la replicazione del DNA non è priva di alterazioni[8] che possono insorgere spontaneamente.

È probabile che ogni mutazione, sia presente anche solo in alcune cellule di tutte quelle comprese nella composizione del tumore; inoltre, nei tumori con difetti nei meccanismi di riparazione del DNA (come quelli caratterizzati da instabilità dei microsatelliti (MSI) o da mutazioni nei geni BRCA1/2) l'accumulo di errori genetici è particolarmente accentuato, alimentando ulteriormente la diversificazione clonale [9]. Le differenti mutazioni che si manifestano gradualmente all'interno delle cellule tumorali, infatti, rappresentano una minaccia ma anche un'opportunità evolutiva per aumentare la sopravvivenza cellulare.

Quanto espresso sopra dunque, rappresenta un aspetto cruciale dell'eterogeneità genetica, ovvero la sua natura dinamica: la popolazione tumorale evolve nel tempo secondo principi darwiniani per i quali i tumori si sviluppano attraverso un processo in cui le mutazioni driver, che conferiscono vantaggio proliferativo, coesistono con numerose mutazioni passenger, apparentemente neutre, fomentando un processo di selezione naturale che favorisce l'espansione di sottocloni aventi vantaggi adattativi, come una maggiore capacità di proliferare, invadere i tessuti o resistere a terapie mirate. Questo processo di selezione clonale porta non solo alla progressione tumorale, ma anche alla comparsa di resistenze terapeutiche, che rappresentano uno dei principali ostacoli nella gestione clinica del cancro [10].

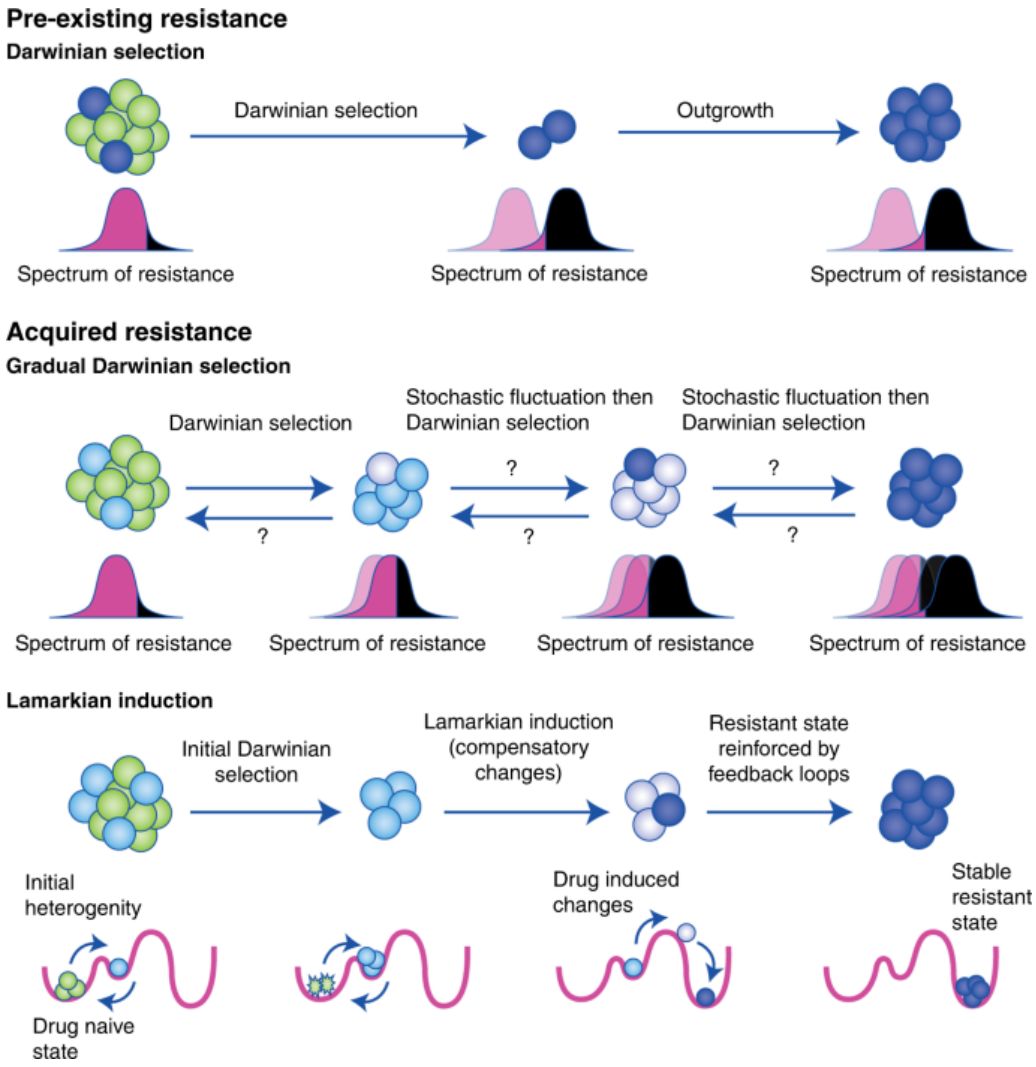


Figura 3. *Selezione darwiniana di stati stabili. (Bell and Gilan, 2020)*

Come già accennato, un punto cruciale del concetto di eterogeneità genetica è quello di complicare notevolmente l'efficacia delle terapie oncologiche. Una terapia target può infatti colpire efficacemente la popolazione dominante sensibile al farmaco, ma lasciare intatte le sottopopolazioni resistenti, che possono successivamente proliferare e causare recidiva[11].

Bisogna sempre però considerare che in un organismo l'accumulo di un certo numero di mutazioni necessarie a renderle nel complesso pericolose, richiede solitamente un lasso di tempo ampio, che può ricadere addirittura nell'ordine dei decenni.

Nei tessuti ad alto turnover, come l'epitelio intestinale, cutaneo o polmonare, eventi mutazionali casuali possono colpire geni coinvolti nel cancro, attivando oncogeni o disattivando geni oncosoppressori [12].

Il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) e dell'esoma (WES) ha rivelato che i sottocloni tumorali si distinguono per lesioni genetiche come mutazioni a singolo nucleotide (SNV), varianti strutturali, indel e alterazioni del numero di copie (CNA)[13].

Grazie a questi sequenziamenti ad alta capacità, è stato possibile dimostrare che un tumore è in grado di contenere addirittura più di 10.000 mutazioni somatiche, con alterazioni di geni correlati al cancro che variano numericamente andando da un minimo di 2 a un massimo di 8 [14]; inoltre, la diversità clonale può ulteriormente essere amplificata dall'instabilità genomica (es. ricombinazione omologa difettosa, instabilità cromosomica, errori nel mismatch repair, vie APOBEC)[15].

Parte delle mutazioni che saranno poi causa della tumorigenesi si accumulano in diverse fasi della stessa [16], motivo per il quale alcuni modelli matematici suggeriscono che in alcuni tumori la maggior parte del carico mutazionale addirittura precede l'inizio del cancro [16].

La presenza di eterogeneità genetica ha anche importanti implicazioni diagnostiche: le biopsie tradizionali, spesso basate su un singolo campione tissutale, potrebbero non rappresentare adeguatamente l'intera diversità del tumore, portando a sottostime delle mutazioni rilevanti per la terapia. Per questo motivo, l'utilizzo di approcci innovativi come strumenti promettenti per catturare una visione più completa e dinamica dell'eterogeneità genetica tumorale, stanno sempre più emergendo [17].

In sintesi, l'eterogeneità genetica non è soltanto una caratteristica intrinseca dei tumori, ma un motore fondamentale della loro evoluzione, resistenza ai trattamenti e capacità metastatica. Comprendere e monitorare questa complessità è essenziale per sviluppare strategie terapeutiche più efficaci e personalizzate.

1.1.2. Eterogeneità non-genetica

Oltre alle mutazioni genetiche, una parte rilevante della complessità tumorale deriva da meccanismi non genetici, che contribuiscono a generare una varietà fenotipica tra le cellule neoplastiche pur in assenza di modificazioni permanenti del DNA. Questi processi includono alterazioni epigenetiche, plasticità cellulare e fenomeni stocastici di regolazione genica, che modulano il comportamento cellulare in modo dinamico e reversibile [18].

Ad eccezioni di mutazioni somatiche rare, tutte le cellule del corpo condividono lo stesso genoma, tuttavia meccanismi non genetici sono responsabili della differenziazione cellulare e tissutale. I pattern genici dipendenti dal contesto influenzano il destino cellulare. L'eterogeneità fenotipica nei tessuti normali può essere deterministica o stocastica [3].

- Deterministica cioè legata a gerarchie di differenziamento, come nelle cripte intestinali o nelle cellule staminali ematopoietiche. Ad esempio, nei tumori si riflette nel concetto di cellule staminali tumorali (CSC) che possono auto-rinnovarsi e generare a sua volta tutte le cellule tumorali: le CSC oltre a essere considerate resistenti a chemio e radio-terapia, contribuiscono a recidiva e metastasi [19].

  In aggiunta alle gerarchie di differenziamento, un altro importante contributo all'eterogeneità non genetica è dato dalla plasticità cellulare, ovvero dalla capacità delle cellule tumorali di cambiare stato funzionale in risposta a segnali ambientali. Le cellule tumorali possono oscillare tra stati proliferativi, quiescenti, differenziati o simili a cellule staminali, in maniera spesso reversibile. Questo fenomeno è particolarmente evidente nei tumori solidi, dove il microambiente tumorale, l'ipossia, le citochine e la pressione terapeutica possono indurre tali transizioni fenotipiche. Tali stati transitori non solo rendono le cellule più adattabili, ma spesso conferiscono loro una maggiore resistenza ai trattamenti, poiché le cellule in stato quiescente o staminale sono meno suscettibili ai farmaci citotossici che colpiscono le cellule in divisione attiva [20].

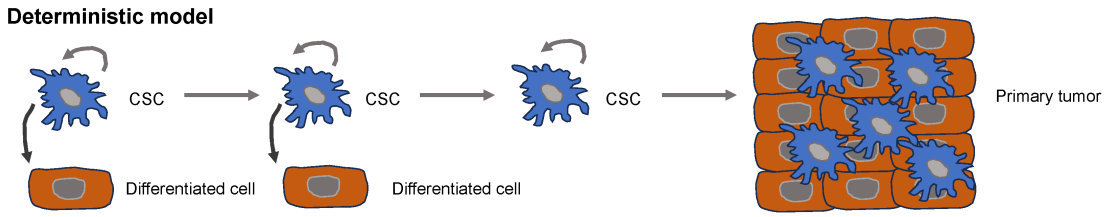


***Figura 4**. Schema rappresentativo del modello deterministico che presenta le CSC all'apice dell'organizzazione gerarchica. (Mierke, 2024)*

- Stocastica cioè dipendente da fluttuazioni casuali nei processi biochimici (come il metabolismo e l'organizzazione della cromatina) che causano variazioni casuali nell'espressione genica tra cellule geneticamente identiche[21]. In una popolazione clonale, le cellule possono esprimere geni in modo variabile per effetto del rumore biologico (biological noise), ovvero l'intrinseca variabilità nei processi molecolari come la trascrizione e la traduzione. Questa variabilità casuale può generare sottopopolazioni cellulari con fenotipi differenti anche in assenza di differenze genetiche o epigenetiche stabili. Tali fluttuazioni possono avere importanti implicazioni cliniche, ad esempio favorendo la sopravvivenza di una piccola frazione di cellule resistenti in seguito al trattamento [13].

Tali fluttuazioni trascrizionali possono portare a oscillazioni transitorie, ma sistemi bistabili/multistabili con isteresi possono consolidare nuovi stati cellulari anche in assenza di stimoli [22]. Le modificazioni epigenetiche, come la perdita di CTCF o la metilazione aberrante, alterano l'espressione genica in modo duraturo, influenzando i fenotipi tumorali, più delle sole mutazioni[23].

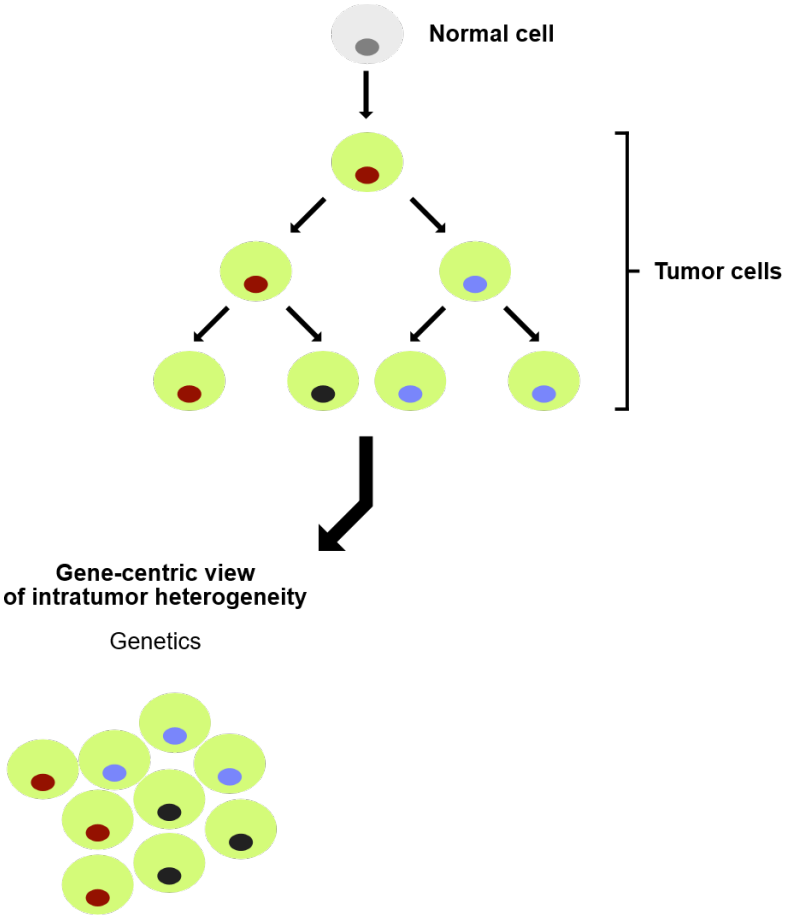


***Figura 5**. L'eterogeneità non genetica nel cancro deriva da variazioni molecolari e cellulari non dovute al DNA, come modifiche epigenetiche, distribuzione asimmetrica delle proteine e variazioni trascrizionali. Queste differenze influenzano il comportamento delle cellule tumorali, contribuendo a resistenza ai farmaci e metastasi, complicando così la cura e il trattamento dei tumori. (Hanahan & Weinberg al. 2011)*

L'eterogeneità non genetica quindi, svolge un ruolo cruciale nell'orchestrare l'espressione genica senza alterare la sequenza del genoma [24].

Nel complesso, l'eterogeneità non genetica è un elemento fondamentale della biologia tumorale. Essa contribuisce in modo significativo alla capacità dei tumori di adattarsi a contesti ambientali mutevoli e di sviluppare resistenza ai trattamenti, rendendoli capaci di sopravvivere anche in condizioni avverse. Comprendere questi meccanismi potenzialmente reversibili apre la strada a nuove strategie terapeutiche mirate alla modulazione epigenetica o alla destabilizzazione della plasticità fenotipica tumorale.

1.1.3. Eterogeneità del microambiente tumorale

Il microambiente tumorale (TME) rappresenta un ecosistema complesso e dinamico costituito da cellule non tumorali e componenti extracellulari che interagiscono strettamente con le cellule neoplastiche. Tra le principali componenti cellulari del TME si annoverano i fibroblasti associati al cancro (CAF), le cellule immunitarie infiltranti il tumore (come linfociti T, macrofagi e neutrofili), le cellule endoteliali e la matrice extracellulare (ECM).

Questi elementi non solo sostengono la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali, ma contribuiscono anche all'eterogeneità tumorale attraverso la produzione di segnali paracrini, citochine e fattori di crescita che modulano il comportamento delle cellule neoplastiche [4] . Inoltre, la composizione del TME può variare in modo sostanziale tra diversi tumori o all'interno dello stesso tumore, contribuendo alla variabilità nella risposta immunitaria e terapeutica[2].

Inoltre, l'ipossia è una caratteristica comune dei tumori solidi, risultante da una vascolarizzazione inefficiente e da un'elevata richiesta metabolica. In condizioni ipossiche, si attivano i fattori inducibili dall'ipossia (HIF), in particolare HIF-1α, che regolano l'espressione di geni coinvolti nella glicolisi, nell'angiogenesi e nella sopravvivenza cellulare.

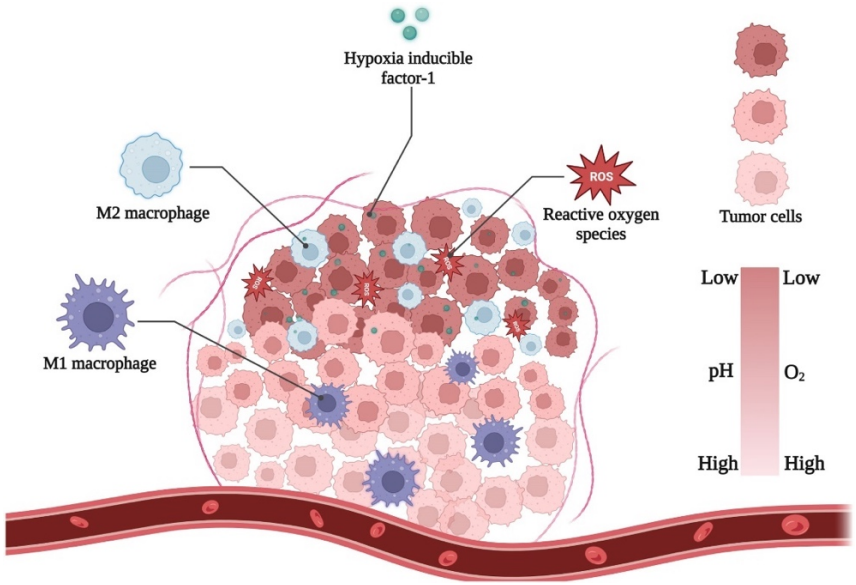


***Figura 6**. Principali caratteri distintivi del microambiente tumorale ipossico. (Xia et al, 2022)*

La composizione del TME può variare significativamente sia tra diversi tipi di tumore che all'interno dello stesso tumore. Ad esempio, studi di trascrittomica spaziale hanno rivelato gradienti di espressione genica nei CAF in tumori multifocali, suggerendo che la posizione all'interno del tumore influisce sul fenotipo cellulare. Inoltre, il TME evolve nel tempo in risposta a pressioni selettive come la terapia, contribuendo alla resistenza ai trattamenti e alla progressione tumorale

1.1.4. Eterogeneità e resistenza ai farmaci

La diversità genetica dei tumori incide sulla risposta ai trattamenti. Le mutazioni genetiche sono una delle cause principali di resistenza, sia iniziale che acquisita. Alcuni tumori recidivanti mostrano varianti preesistenti a bassa frequenza prima del trattamento.

Esempio emblematico: mutazioni del gene di fusione BCR-ABL causano recidiva nella leucemia mieloide cronica trattata con imatinib [25].

Tuttavia, in molti casi la resistenza non ha una causa genetica identificabile. Le modifiche epigenetiche giocano un ruolo cruciale[26] [27]. L'attività di KDM5B, ad esempio, aumenta la variabilità trascrizionale, favorendo la resistenza endocrina.

Inoltre, le fluttuazioni casuali nelle proteine pro-apoptotiche generano risposte eterogenee anche tra cellule geneticamente identiche [28]. In questo caso alcune condizioni del microambiente tumorale come l'ipossia sono la causa di tratti più aggressivi e resistenti nei tumori [29].

Infine, anche se temporanea, questa resistenza può essere trasmessa a cellule figlie, che potrebbero successivamente acquisire mutazioni o modifiche epigenetiche stabili, consolidando un clone resistente.

1.2. Plasticità cellulare

La plasticità è la capacità delle cellule di acquisire nuovi stati o fenotipi attraverso programmi di differenziazione e in quanto tale rappresenta una delle sfide più complesse e affascinanti dell'oncologia moderna. Si tratta della capacità delle cellule tumorali di modificare dinamicamente il proprio stato cellulare in risposta a stimoli ambientali o terapeutici, un meccanismo che consente loro di sopravvivere, proliferare o addirittura sfuggire ai trattamenti, acquisendo nuove caratteristiche[30,31]. Questa adattabilità non è casuale, ma è orchestrata da una fitta rete di segnali molecolari e fattori regolatori che agiscono su diversi livelli: dalla segnalazione intracellulare classica, alle modifiche epigenetiche, fino all'interazione con il microambiente tumorale e al coinvolgimento di fattori non codificanti.

Sorprendentemente, tutte le cellule degli organismi pluricellulari possiedono l'informazione genetica necessaria per manifestare plasticità, contenuta nel loro genoma. In un contesto più artificiale, i noti fattori di Yamanaka (SOX2, OCT4, KLF4 e MYC) sono in grado di indurre la pluripotenza, uno stato di plasticità acquisita che richiama quello delle cellule staminali[32].

Uno degli aspetti più interessanti di questa capacità è la cosiddetta "lineage plasticity", che definisce il concetto per il quale, le cellule tumorali possono cambiare "identità"[33], acquisendo caratteristiche tipiche di altre linee cellulari, incluse cellule staminali o differenziate, oppure assumere tratti di tessuti completamente diversi da quello di origine, come muscolo o cute [34]. Questo concetto è stato più volte dimostrato nel corso degli anni, mostrando come le cellule tumorali possano attivare programmi trascrizionali e differenziativi alternativi per adattarsi a condizioni ostili o a pressioni selettive, come quelle indotte dalle terapie.

Come già anticipato, a rendere possibile tale flessibilità è anche un processo di riprogrammazione epigenetica, che modifica in modo profondo, ma potenzialmente reversibile l'espressione genica. Qui entrano in gioco meccanismi come la metilazione del DNA, le modifiche istoniche (metilazione e acetilazione degli istoni) e il rimodellamento della cromatina, che rendono più o meno accessibili determinate regioni del genoma. In questo modo, le cellule tumorali possono ricominciare ad esprimere geni precedentemente silenti o viceversa, silenziarne altri fino a quel momento attivi,

rimodellando rapidamente il proprio profilo funzionale [35]. In particolare, le cellule eucariotiche hanno sviluppato meccanismi distinti per favorire la plasticità, tra cui la regolazione epigenetica[36], il controllo dello splicing alternativo dell'mRNA[37], l'attivazione trascrizionale di promotori alternativi e il controllo della traduzione tramite la regione 3'UTR.

Grazie allo sviluppo di tecnologie sempre più raffinate e specifiche, come il sequenziamento a singola cellula, si è arrivato con il tempo alla scoperta che i tumori non sono composti da cellule tutte uguali, ma bensì da popolazioni estremamente eterogenee, che coesistono in una sorta di "paesaggio molecolare dinamico", arrivando alla conclusione che i tumori si comportano come ecosistemi in cui diversi stati cellulari emergono e si alternano, contribuendo alla progressione della malattia [38].

Per via di queste motivazioni, fortemente impattanti in campo scientifico, l'attenzione si sta sempre più spostando verso strategie terapeutiche che mirano a colpire la plasticità stessa, e non le singole popolazioni cellulari, come fatto finora. Intervenire su questa capacità di trasformazione significa impedire alle cellule tumorali di transitare per sfuggire al trattamento. In quest'ottica, si studiano con interesse farmaci epigenetici come gli inibitori delle DNA metiltransferasi (DNMT), dell'istone deacetilasi (HDAC), delle metiltransferasi istoniche (HMT), così come rimodellatori cromatinici o anticorpi diretti contro fattori chiave delle transizioni fenotipiche, come quelli coinvolti nell'EMT (epithelial-to-mesenchymal transition).

1.2.1. Plasticità durante lo sviluppo e la rigenerazione tissutale

Studi fondamentali hanno dimostrato che le cellule embrionali trapiantate in diverse posizioni all'interno dell'embrione sono in grado di differenziarsi in diversi tipi cellulari. Questa differenziazione è guidata dall'attività locale dei morfogeni, molecole segnale responsabili dello sviluppo embrionale: un fenomeno noto come competenza [39]. Tuttavia, gli stadi di sviluppo giocano un ruolo cruciale nella regolare tale plasticità. Uno studio storico del gruppo di Spemann ha dimostrato che, negli embrioni di anfibi, l'ectoderma neurale prelevato nelle fasi precoci della gastrulazione viene influenzato dall'ambiente

dell'ospite, mentre lo stesso tessuto prelevato nelle fasi tardive mantiene il suo destino originale [40].

Sebbene i tessuti adulti conservino un certo grado di plasticità, il suo potenziale diminuisce con l'avanzare della differenziazione. Le cosiddette cellule staminali adulte sono responsabili del rinnovamento tissutale in condizioni di omeostasi fisiologica[41]: esempi notevoli sono il rifornimento delle cellule epiteliali nelle cripte intestinali ad opera di un piccolo pool di cellule staminali adulte che esprimono il recettore LGR5[42], ma anche le cellule della pelle e le cellule ematopoietiche [43]. Tuttavia, non tutti i tessuti adulti derivano direttamente da cellule staminali, quindi la plasticità non è confinata esclusivamente a queste [44].

Gli organismi metazoici hanno la capacità di riparare e rigenerare molti tipi di tessuto dopo un danno [45,46]. Questa capacità rigenerativa è legata all'aumento della plasticità delle cellule staminali adulte. Ad esempio, quando la pelle subisce una lesione, le cellule staminali responsabili della crescita dei peli possono differenziarsi e acquisire caratteristiche delle cellule staminali cutanee pur mantenendo alcune delle loro proprietà specifiche [47]. Un altro esempio è la rigenerazione epatica: epatociti e cellule biliari possono mostrare plasticità epiteliale di linea per ripristinare l'epitelio epatico dopo un danno tissutale [48].

Variazioni nell'accessibilità della cromatina, la perdita dell'attività dei fattori trascrizionali omeostatici e l'espressione simultanea di fattori trascrizionali specifici di altre linee cellulari possono spiegare parzialmente i meccanismi della transdifferenziazione. Tuttavia, i meccanismi alla base della plasticità saranno esplorati più in dettaglio nelle prossime sezioni.

1.2.2. Transizione epitelio-mesenchimale (EMT)

La transizione epitelio-mesenchimale o EMT descrive il processo attraverso cui le cellule epiteliali, che costituiscono il rivestimento di organi e ghiandole, perdono la loro adesione cellula-cellula, la loro polarità e stabilità, acquisendo forma, mobilità e capacità invasive tipiche delle cellule mesenchimali [49], come una maggiore mobilità e la capacità di migrare attraverso i tessuti. Questo non è un fenomeno statico, ma continuo, infatti è frequente

incontrare stati intermedi o ibridi, caratterizzati da espressione simultanea di marker epiteliali (E-cadherina, claudina) e mesenchimali (vimentina, N-cadherina)[50]; fenomeno originariamente scoperto da Greenburg e Hay, che osservarono la trasformazione morfologica di cellule epiteliali adulte e embrionali in coltura tridimensionale[51]. Questi Stati ibridi offrono un mix adattativo: mobilità per l'invasione, coesione per la migrazione collettiva e robustezza per la resistenza ai trattamenti. La regolazione molecolare coinvolge fattori di trascrizione dell'EMT (Snail, Slug, ZEB1/2, Twist) che reprimono geni epiteliali e promuovono quelli mesenchimali, spesso attivati da vie segnalatorie (TGFβ, Notch, Wnt, EGFR) [52].

Alcuni studi collegano EMT all'acquisizione di tratti stem-like e di resistenza farmacologica: le cellule E/M dimostrano aumentata sopravvivenza in condizioni di stress e maggiore capacità metastatica[52].

Altri studi dimostrano un ruolo cruciale dell'EMT nello sviluppo embrionale [53]. Durante lo sviluppo dei metazoi, le cellule epiteliali spesso migrano a lunghe distanze per raggiungere il loro destino finale; per diventare migratorie, devono cambiare l'espressione genica, riorganizzare il citoscheletro e perdere la polarità apico-basolaterale. Durante la gastrulazione, ad esempio, le cellule subiscono passaggi EMT per formare endoderma e mesoderma a partire dall'ectoderma[54]. L'EMT influisce anche sulla risposta immunitaria e sulla resistenza a immunoterapie, modulando l'espressione di PDL1 e favorendo un microambiente immunosoppressivo.

La transizione epitelio-mesenchimale ha un ruolo fondamentale nello sviluppo del cancro. Durante la tumorigenesi, infatti, le cellule epiteliali cancerose possono acquisire tratti mesenchimali che permettono loro di invadere i tessuti circostanti e successivamente metastatizzare. L'attivazione dell'EMT è responsabile dell'acquisizione della capacità metastatica [55]. L'EMT può essere indotto da vari stimoli del microambiente tumorale, come ipossia[56], risposta immunitaria [57] o stress meccanico[58]. Anche le alterazioni epigenetiche possono scatenare l'EMT, ad esempio tramite la metilazione anomala dei siti CpG che inibisce la trascrizione di miR-200, un noto soppressore dell'EMT , o ancora può essere indotto dà segnali autocrini e paracrini secreti dalle cellule stromali e da sottocloni tumorali, in un meccanismo cooperativo [59]. Esempi includono: TGFβ, EGF, FGF, IL-6, WNT, Hedgehog, Notch.

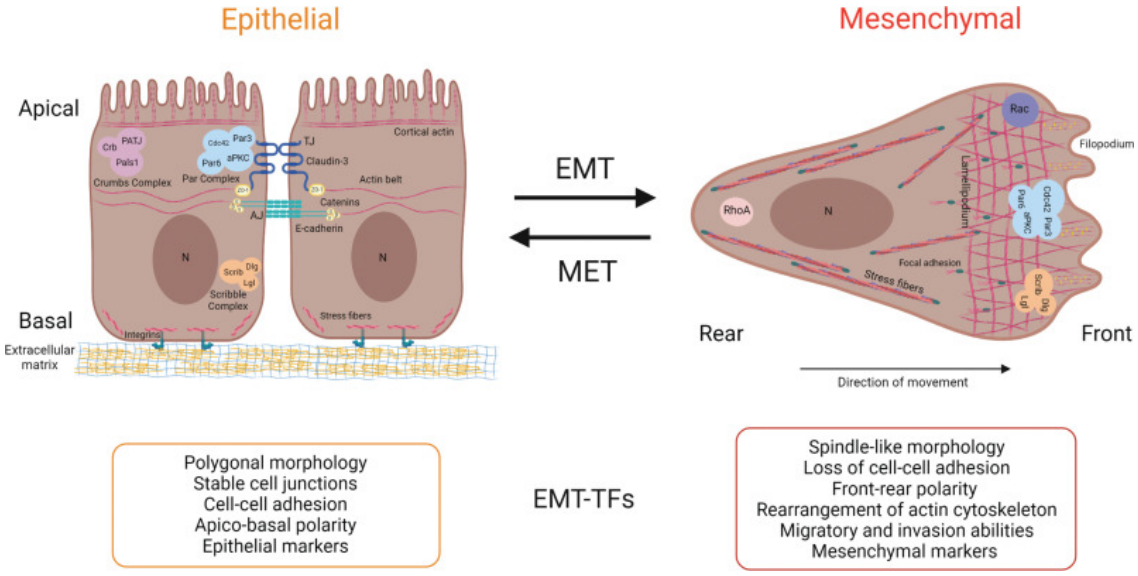


***Figura** 7. Schema generale del processo di EMT. (Morgado Diaz et al, 2022)*

Tuttavia, è comunque necessario sottolineare che le cellule tumorali possono anche migrare in maniera collettiva senza attivare l'EMT, sfruttando meccanismi simili a quelli dello sviluppo embrionale [60].

Una volta metastatizzati i tumori raggiungono facilmente varie parti dell'organismo diventando molto più aggressivi e espandendo notevolmente la massa del tumore stesso, questo però non preclude il fatto che agli antipodi dell'EMT vi è un altro processo chiamato transizione mesenchimale-epiteliale (MET)[61], che in concomitanza con esso può causare formazione di nuove metastasi in sedi distanti dal tumore primario.

Da questo possiamo evincere che il cancro e tutto ciò che lo concerne si associano ad un concetto profondamente complesso, che non è mai definito da una netta separazione, ma spesso è associato a situazioni difficilmente interpretabili; ad esempio in molte cellule tumorali esistono degli stati ibridi tra quello epiteliale e quello mesenchimale, che co-esprimono marcatori di entrambe le condizioni: EMT parziale [62]. Questo genera una forte eterogeneità fenotipica nei tumori, con sottopopolazioni dotate di firme epigenetiche e trascrizionali distinte[63].

1.2.3. Plasticità epigenetica e stati cellulari del cancro

La plasticità epigenetica consente adattamenti dinamici nell'espressione genica senza modificare la sequenza del DNA, permettendo così rapidi cambiamenti fenotipici. Nei tumori, questo si traduce spesso nella presenza della cromatina in uno stato permissivo, in cui promotori e potenziatori di geni oncogenici risultano più accessibili, facilitando la trascrizione aberrante [64].

Tale condizione favorisce processi chiave nella progressione tumorale, tra cui l'EMT (transizione epitelio-mesenchimale), la conversione verso stati staminali e l'acquisizione di fenotipi cellulari alternativi, come evidenziato negli studi sulla plasticità cellulare [65]. I meccanismi epigenetici coinvolti includono la metilazione del promotore di E-cadherina, modifiche istoniche come H3K27me3 e H3K9me3, rimodellamento della cromatina e l'azione regolatoria di microRNA [66].

Inoltre, la plasticità epigenetica è cruciale nella risposta ai trattamenti oncologici: in presenza di terapia, alcune cellule tumorali possono acquisire uno stato dormiente o diventare cellule persistenti tolleranti alla terapia (DTPs), caratterizzate da profili epigenetici distintivi. Tali cellule sopravvivono in condizioni avverse e possono riattivarsi dopo l'interruzione della terapia, contribuendo a recidive tumorali [67].

Per identificare e studiare queste transizioni fenotipiche e gli stati cellulari instabili, vengono impiegati modelli computazionali che definiscono "attrattori" nel paesaggio epigenetico e genico del tumore. Questi strumenti aiutano a prevedere i cambiamenti di stato e a progettare strategie terapeutiche mirate, volte a stabilizzare i fenotipi cellulari differenziati mediante l'uso di inibitori di DNMT (DNA metiltransferasi), HDAC (deacetilasi istoniche) e modulatori del rimodellamento cromatinico [68] [69].

1.3. Carcinoma alla mammella

Il carcinoma della mammella è il tumore più comunemente diagnosticato nelle donne, con una stima di 2,26 milioni di nuovi casi nel 2020 e 684.996 decessi stimati (World Cancer Research Fund International). Si tratta di una patologia estremamente eterogenea, caratterizzata da un'elevata eterogeneità sia intra-tumorale che inter-tumorale[70–72]. Sono stati identificati e classificati diversi sottotipi di carcinoma della mammella, basati su

caratteristiche genetiche e fenotipiche uniche. In particolare, la classificazione basata sui recettori consiste nella valutazione dell'espressione dei recettori ormonali del recettore degli Estrogeni (ER) e del recettore del Progesterone (PR), in combinazione con l'espressione del Recettore 2 del Fattore di Crescita Epidermico (HER2/Neu), oltre ad ulteriori profili genomici e trascrittomici.

Questa classificazione identifica quattro sottotipi:

- Luminal A (ER+, PR+, HER2–), che rappresenta il 50% dei casi;
- Luminal B (ER+, PR+ in alcuni casi, HER2 -), il 15% dei casi;
- HER2 (ER+ in alcuni casi, PR+ in altri casi), il 20% dei casi;
- Carcinoma triplo negativo (TNBC) (ER -, PR -, HER2 -), che comprende il 15% dei casi.

Questi sottotipi vanno da quello con la prognosi migliore (Luminal A) a quello con la prognosi peggiore (TNBC) [73]. Inoltre, la profilazione molecolare condotta negli anni 2000 ha ulteriormente ampliato le sotto classificazioni del carcinoma della mammella, identificando: sottotipo basale, Luminali di tipo A, Luminali di tipo B, Luminali di tipo ER -, AR+ (Recettore degli androgeni), o ancora un particolare caso di HER2, caratterizzato da un tessuto simile a quello mammario normale ma con una bassa espressione della claudina [74–77]. Queste categorie hanno un impatto sostanziale sulla prognosi, poiché ciascun sottotipo varia in termini di sopravvivenza, tasso di crescita, probabilità di recidiva e potenziale metastatico [78–80].

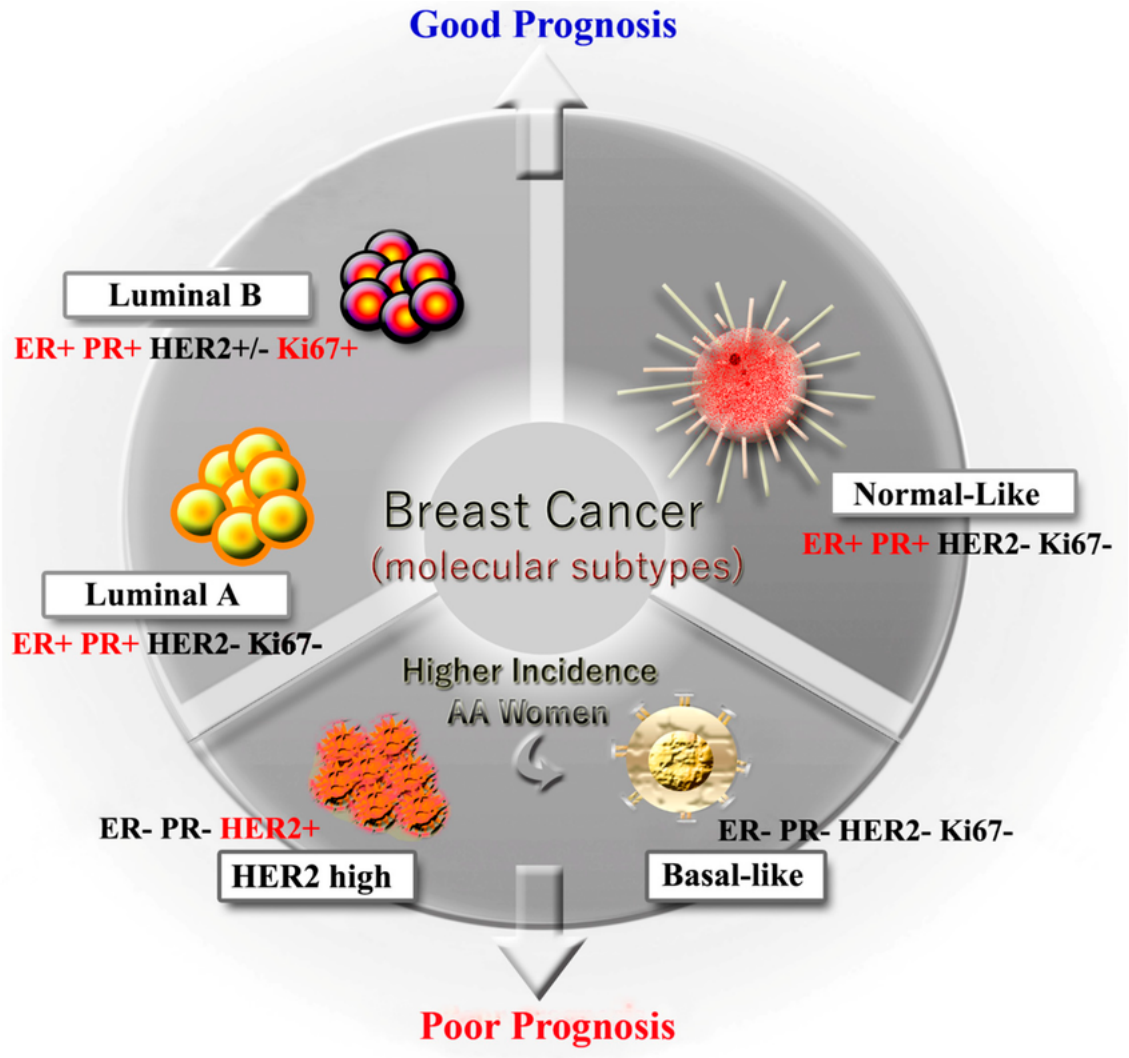


***Figura 8**. Differenti sottotipi molecolari di carcinoma alla mammella. (Charan et al., 2020)*

1.3.1. Modelli di transizione stocastica degli stati cellulari nel carcinoma alla mammella

Gupta et al. (2011)[81] hanno dimostrato che due linee cellulari di carcinoma mammario triplo negativo (TNBC), SUM149 e SUM159, passano frequentemente da uno stato cellulare all'altro, fenomeno osservato anche in altri tipi di tumore [3,82,83]. Queste transizioni sono stocastiche, cioè avvengono in modo casuale all'interno delle cellule. Gli autori hanno osservato che, dopo l'isolamento di specifici stati differenziati (basali, luminali e tipo staminale), le sottopopolazioni cellulari pure, tornano entro sei giorni alle

frequenze originali degli stati osservati nella popolazione parentale, raggiungendo un equilibrio stazionario. Gli stati di differenziazione sono stati isolati tramite cell sorting basato sull'espressione di specifici marcatori di superficie (EPCAM, CD24, CD44).

È interessante notare che il tempo richiesto (solo pochi giorni) indica che questa caratteristica è indipendente dal diverso tasso di proliferazione di ciascuno stato cellulare. Si può ipotizzare, dunque, un meccanismo intrinseco alla cellula che regoli tale inter-conversione. Inoltre, l'utilizzo di linee cellulari dimostra che il microambiente tumorale non contribuisce al ripristino delle proporzioni di equilibrio. Gupta et al. (2011) si sono concentrati sulla generazione di un modello matematico di Markov per descrivere e prevedere le transizioni biologiche di cellule purificate di SUM149 e SUM159. Matematicamente, il modello di Markov assume che la probabilità che una cellula transiti verso uno stato diverso dipenda solo dallo stato attuale della cellula. Pertanto, l'equilibrio delle frequenze degli stati, che può essere previsto, è determinato solo da questi tassi di transizione e non da altri fattori.

Solitamente, si pensa che la coesistenza di molteplici stati cellulari all'interno di un tumore sia causata dalla cooperazione tra cellule o da un'evoluzione del tumore. Tuttavia, se le cellule si trovano in uno stato di transizione costante, la presenza di più stati cellulari è una conseguenza naturale e non richiede un processo selettivo. In modo affascinante, cresce l'evidenza che i principali stati cellulari osservati nei tumori siano presenti anche in alcune linee cellulari, come nei modelli di carcinoma epatico e di carcinoma polmonare non a piccole cellule [84,85], confermando che le transizioni stocastiche non sono una caratteristica specifica delle colture 2D, ma sono presenti anche nei tumori, nonostante il ruolo determinante di fattori genetici e micro-ambientali nell'incrementare l'eterogeneità tumorale.

In questo contesto si inserisce anche la linea cellulare MDA-MB-468, un modello ampiamente utilizzato di carcinoma mammario triplo negativo di tipo basale [86], che presenta caratteristiche biologiche rilevanti per lo studio della plasticità cellulare. La linea cellulare MDA-MB-468 esprime marcatori tipici dello stato epiteliale come EPCAM e CD24, ma è anche nota per la caratteristica di possedere anche una popolazione minoritaria di cellule con fenotipo mesenchimale o tipo staminale, suggerendo la presenza di uno spettro di stati differenziativi e una potenziale inter-conversione cellulare [87,88].

In particolare, nel mio progetto, la popolazione mesenchimale delle MDA-MB-468 è stata caratterizzata tramite l'espressione del marcatore CD56 (NCAM), un antigene di adesione neuronale noto per essere associato a fenotipi migratori, mesenchimali e aggressivi in diversi tipi tumorali [89] [90]. L'espressione di CD56 ha permesso di distinguere sottopopolazioni con comportamento fenotipico differente, evidenziando un ulteriore livello di eterogeneità funzionale all'interno di un'unica linea cellulare. L'identificazione della popolazione CD56+ ha fornito un valido sistema per lo studio delle transizioni tra stati epiteliali e mesenchimali, contribuendo a decifrare i circuiti regolatori alla base della plasticità.

Studi recenti trascrittomici single-cell hanno inoltre confermato che le MDA-MB-468 contengono sottotipi coesistenti all'interno della stessa popolazione clonale, riflettendo una capacità intrinseca di generare variabilità senza stimoli esterni [91,92]. Questo supporta ulteriormente l'idea che la plasticità fenotipica intrinseca sia un meccanismo fondamentale per l'adattamento tumorale e per la resistenza terapeutica. Inoltre, esposizioni a trattamenti come l'inibitore del fattore EGFR o chemioterapici hanno mostrato di alterare temporaneamente la composizione di sottotipi cellulari nelle MDA-MB-468, ma spesso seguite da un ripristino dell'equilibrio originario, suggerendo un comportamento simile a quanto osservato nelle linee SUM149 e SUM159 [93].

Questi risultati suggeriscono che le transizioni stocastiche sono una caratteristica comune dei tumori e che potrebbero essere altrettanto essenziali nel promuovere l'eterogeneità tumorale quanto le forze genetiche, non genetiche e micro-ambientali. Gli interventi clinici, come la chemioterapia o le terapie mirate, potrebbero influenzare i tassi di transizione tra stati cellulari. Auspicabilmente, tali trattamenti potrebbero essere usati per colpire uno stato cellulare aggressivo rispetto a uno meno aggressivo, o meglio ancora, per interrompere i meccanismi alla base del cambiamento.

Nonostante il lavoro di Gupta et al. (2011), non è ancora chiaro come vengano mantenute le proporzioni degli stati cellulari all'interno di una popolazione, né come tali transizioni avvengano così rapidamente. Con queste premesse, il mio progetto di tesi magistrale, incentrato sulla linea cellulare MDA-MB-468, si propone di affrontare le problematiche sopra menzionate, estendendo il modello delle SUM149 e SUM159 alla comprensione dei meccanismi di transizione stocastica, plasticità fenotipica e regolazione degli equilibri

funzionali nelle cellule CD56 positive e negative del carcinoma mammario triplo negativo.

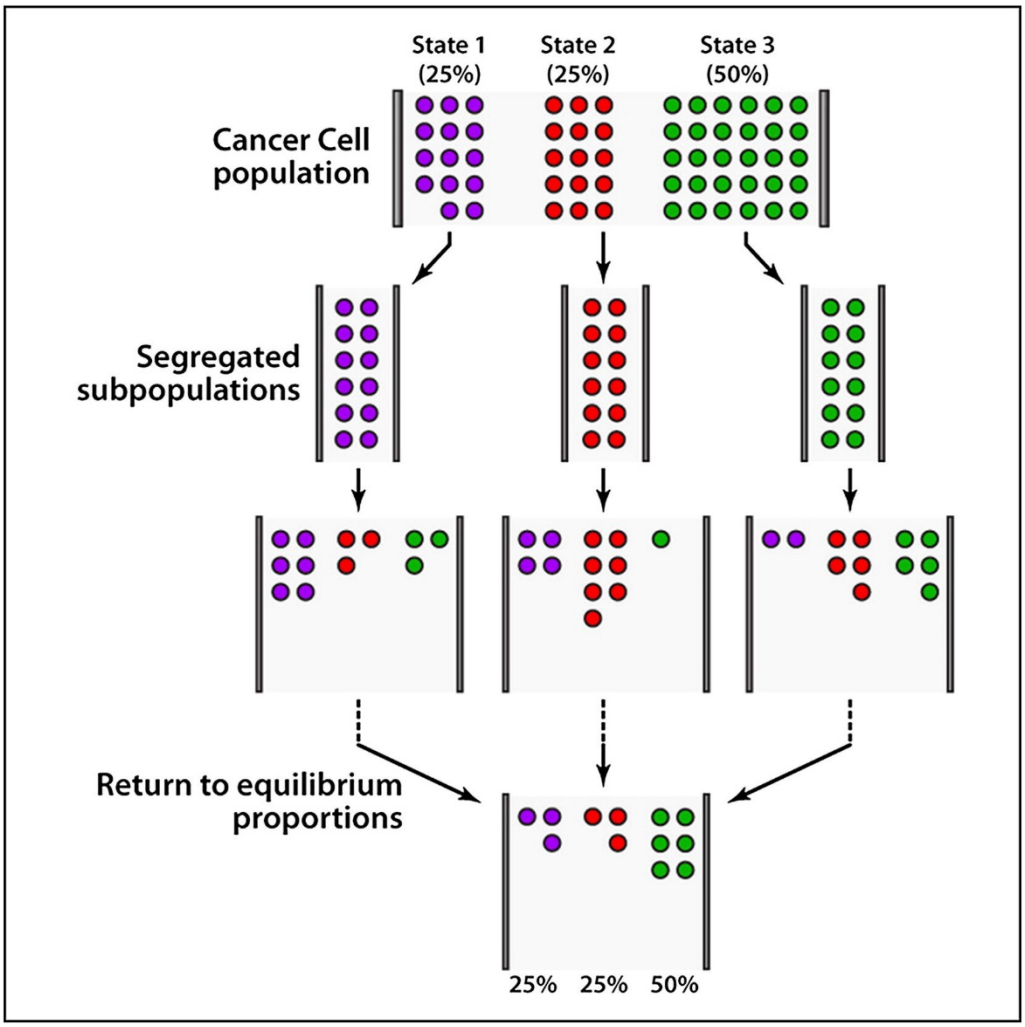


***Figura 9**. Popolazioni di cellule di cancro che inter-convertono tra gli stati fenotipici. (Gupta et al., 2011)*

2. Materiali e metodi

2.1. Colture cellulari

Le cellule SUM149 sono state coltivate in terreno HAM'S F 12 (Gibco, #21765029), integrato con il 5 % di siero fetale bovino (FBS, Gibco, #10270106), 1% antibiotici (Pen/Strep, Euroclone, #ECB3001D), insulina (5 µg/mL, Sigma,# 10516), idrocortisone (1 µg/mL, Sigma, #H0888) e HEPES (10 mM, Gibco, #15630056).

Le cellule MCF7 e le MDA-MB-468 sono state coltivate in DMEM (Euroclone, #ECM0728L) integrato con 10 % siero fetale bovino (FBS, Gibco #10270106) e 1% antibiotici (Pen/strep).

Le cellule MDA-MB-436 e HCC- 1937 sono state coltivate in terreno RPMI (Euroclone, #ECB2000), addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FBS, Gibco, #10270106) e 1% di antibiotici (Pen/Strep).

2.2. Citometria a flusso

Le colture cellulari sub-confluenti (80-90%) sono state lavate con PBS per rimuovere il terreno, staccate singolarizzate e contate, sono state poi fissate con PFA (paraformaldeide) diluita al 4 % in DPBS. Le cellule sono state colorate con anticorpi specifici per i marcatori di superficie delle cellule umane: EPCAM–FITC (1:50, anticorpo monoclonale murino, clone VU–ID9, AbCAM, #ab8666), CD24–PE (1:25, monoclonale murino, clone ML5, #555428), CD44–APC (1:25, monoclonale murino, clone G44-26, BD Biosciences, #559942) e CD49f–BV421 (1:1.500, monoclonale di ratto, clone GoH3, BD Biosciences, #747725), CD56- PE (1:50, topo monoclonale, clone VU-ID9, N-CAM, #ab8666), CD104 (1:20 monoclonale murino, clone GOH3) PDGFR-a-PE (1:20 monoclonale murino, clone 16A1, #323508). Per ogni reazione di colorazione, le cellule sono state incubate con anticorpi diluiti in FACS Buffer (PBS 1X, 2,5 mM EDTA, 10 mM HEPES, 2% BSA) per 20 min a temperatura ambiente. L'anticorpo non legato è stato lavato via con eccesso di PBS e le cellule sono state classificate a 4 °C con BD FACSAria Fusion entro un'ora dalla colorazione. Le analisi FACS sono state effettuate con CytoFLEX S e CytoFLEX LX. Come controlli, sono stati utilizzati anticorpi isotipici: FITC-IgG1 κ

(1:50, monoclonale murino, clone MOPC-21, BD Biosciences #555909), PE-IgG2a κ (1:50, clone G155-178, BD Biosciences #555574) e APC-IgG2b κ (1:50, clone 27-35, BD Biosciences #555745).

2.3. Immunofluorescenza

Le tecniche di immunofluorescenza sono state utilizzate per studiare la localizzazione delle proteine della superficie cellulare. In breve, le cellule sono state coltivate su vetrini da 13 mm precedentemente rivestite con celltack (Sigma, #P4957) e centrifugate per 15 minuti con decelerazione 0 a 300 G. Dopo circa due ore, le cellule sono state lavate due volte con PBS e fissate in paraformaldeide (PFA) al 4% in H2O per 15 minuti a temperatura ambiente, quindi lavate due volte in PBS, permeabilizzate e bloccate in PBS-T (PBS, Triton X-100 0,1%, 5% di siero normale di capra e albumina di siero bovino all'1%) per 1 ora a temperatura ambiente. Gli anticorpi primari sono stati diluiti in PBS-T e incubati overnight a 4 °C, sotto agitazione. Poi, le cellule sono state ulteriormente lavate per 2 volte con PBS e incubate con anticorpi secondari, anti-mouse 488 (Eugene #2247988) e anti-rabbit 568 (Eugene #2192277) entrambi con diluizione1:500 e DAPI (1:1000, 5 mg/mL, lunghezza d'onda di eccitazione: 358 nm; lunghezza d'onda di emissione: 461 nm; Molecular Probes, #D3571) in PBS per 2 ore a temperatura ambiente, in agitazione. Infine, i vetrini sono stati lavati in PBS due volte e una volta in acqua, montati su vetrini per microscopio utilizzando ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, #P36930). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti-Vim di topo (1:250, monoclonale, clone V9, biotecnology Santa Cruz, #sc-6260). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi secondari: goat anti-rabbit (1:500 Alexa Fluor, Molecular Probes), goat anti-mouse (1:500 Alexa Fluor, Molecular Probes).

2.4. Analisi di imaging

Le cellule MDA-MB-468, sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale con obiettivo 63X/1.40 NA Oil e analizzate con il software LAS AF (Leica SP5). Il microscopio confocale è un particolare tipo di microscopio in cui la risoluzione ottica e il contrasto di un'immagine sono migliorati utilizzando un'illuminazione puntuale che consente l'esclusione della luce fuori fuoco nella formazione dell'immagine. Al fine di consentire una discriminazione dei segnali più sensibile, sono state ottenute sezioni

confocali mediante acquisizione a diversi livelli lungo l'asse ottico delle sezioni z (risoluzione z di 0,29 μm). Le analisi comparate di rappresentazione sono state effettuate parallelamente con i parametri identici dell'acquisizione. Le immagini sono state acquisite con il software Las X, trattate con il software Fiji (https://fiji.com).

2.5. Estrazione RNA e PCR quantitativa real-time

L'RNA totale è stato estratto da cellule sorted e non sorted con RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit (Life Technologies, #AM1931). L'RNA è stato quantificato con NanoDrop™ 8000 (ThermoFisher). Lo stesso quantitativo di RNA è stato retro-trascritto con ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, #A3800). La PCR in tempo reale è stata eseguita con SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, #4364346) su ViiA7 Real Time PCR System (Applied Biosystems). I livelli di espressione genica sono stati normalizzati rispetto al gene housekeeping TBP. I primer sono elencati nel testo.

L'elenco dei primers è fornito qui di seguito:

CD24 FWD: CACGCAGATTTATTCCAGTGAAAC
CD24 REV: GACCACGAAGAGACTGGCTGTT

CDH1 FWD: GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG

CDH1 REV: TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG

CDH2 FWD: CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC

CDH2 REV: GTAGGATCTCCGCCACTGATTC

VIM FWD: AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA

VIM REV: ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT

ZEB1 FWD: GGCATACACCTACTCAACTACGG

ZEB1 REV: TGGGCGGTGTAGAATCAGAGTC

SNAI1 FWD: ACTATGCCGCGCTCTTTC

SNAI1 REV: GCTGGAAGGTAAACTCTGGATT

SNAI2 FWD: CTTCCTGGTCAAGAAGCATTTC

SNAI2 REV: GGGAAATAATCACTGTATGTGTGT

TWIST1 FWD: ACTGGACACACATACAGTGATTAT

TWIST1 REV: GAATGGAGCAGCGGTAGTC

CD56 FWD: CATCACCTGGAGGACTTCTACC

CD56 REV: CAGTGTACTGGATGCTCTTCAGG

2.6. Generazione della linea cellulare reporter SUM149

Per discriminare stati cellulari luminali e basali, sono stati progettati due costrutti lentivirali reporter. Il promotore del gene CLDN7, identificato dal nostro dataset di RNA-seq come marcatore luminale, è stato clonato a monte della sequenza codificante per EGFP. In parallelo, il promotore del gene VIM, anch'esso emerso dall'analisi trascrittomica come marcatore basale, è stato clonato a monte della sequenza codificante per mKATE2. I costrutti sono stati assemblati in backbone lentivirali di terza generazione mediante clonaggio convenzionale e sequenziati per verificarne l'integrità. Le particelle virali sono state prodotte mediante trasfezione transiente di cellule HEK293T con i plasmidi reporter insieme ai plasmidi di imballaggio (pMDLg/pRRE, pRSV-Rev e pMD2.G) utilizzando un reagente lipofettante standard (Lipofectamine 3000, ThermoFisher). Il surnatante contenente le particelle virali è stato raccolto a 48 e 72 ore, filtrato (0.45 μm) e concentrato tramite ultracentrifugazione. La linea cellulare SUM149 è stata infettata con i lentivirus reporter a un MOI <1 in presenza di Polybrene (8 μg/mL) per favorire l'ingresso virale. Dopo 48 ore dall'infezione, le cellule sono state sottoposte a selezione antibiotica per arricchire la popolazione reporter-positiva. L'espressione dei reporter fluorescenti (EGFP e mKATE2) è stata monitorata mediante microscopia a fluorescenza e citometria a flusso.

2.7. Sensibilità cellulare al trattamento farmacologico

Per valutare la sensibilità delle cellule SUM149 e MCF7 ai trattamenti farmacologici con TGF-b (Transforming Growth Factor Beta) e TNF-a (Tumor Necrosis Factor Alpha) e di temsyrolimus (MedChem Cat#S1044) e rapamicina (MedChem Cat # S1039) sono state usate concentrazioni crescenti dei farmaci.

Temsyrolimus (TEMs) e rapamicina (RAPA) sono due inibitori del pathway di mTOR, in particolare inibiscono mTORC1 tramite il legame con FKBP12; mentre TGF-b e TNF-a sono due induttori dell'EMT.

Sono state seminate 50.000 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti in 2 ml di terreno completo, per tutti i trattamenti sulle MCF7, e per le SUM149 solo per valutare i risultati di TEMs e RAPA; dopo 72 ore la vitalità è stata valutata con analisi al FACS e normalizzata rispetto al DMSO.

Invece per valutare i risultati con TGF-b e TNF-a per le cellule SUM149, ne sono state piastrate 1.500 cellule/pozzetto in piastre nere da 96 pozzetti in 50 µL di terreno completo e poi aggiunti 50 µL di terreno contenente DMSO o i farmaci; le cellule sono state fatte crescere e monitorate all'Incucyte (Sartorius) per 120 ore acquisendo 43.200 immagini (1 per ogni ora), La proliferazione è stata valutata tramite conta cellulare basato sul rilevamento dei confini cellulari assistito dall'intelligenza artificiale. delle cellule verdi e rosse da immagini a 4X e 10X e normalizzata al giorno 0.

2.8. Infezione lentivirale

Per sovra-esprimere GFP, è stato utilizzato il vettore lentivirale pLenti-C-Myc-DDK-IRES-PURO.
Per la produzione virale, le cellule HEK293T sono state trasfettate tramite protocollo $CaCl_2$ con la seguente miscela:

- 10 µg vettore di trasferimento
- 6,5 µg vettore di impacchettamento ΔR8.74
- 3,5 µg Env VSV-G
- 2,5 µg REV
- H_2O distillata fino a 450 µL
- 50 µL $CaCl_2$ 2.5 M
- 500 µL HBS 2X

La miscela è stata aggiunta goccia a goccia alle cellule HEK293T in piastre da 15 cm. Il mezzo è stato cambiato dopo 16 ore. Dopo ulteriori 24 ore, il mezzo contenente le particelle virali è stato raccolto, centrifugato a 1.200 rpm, filtrato su filtro da 0,45 μm e precipitato con PEG-it 5X (Systembio, #LV825A-1) a 4 °C per una notte. Le particelle virali sono state recuperate per centrifugazione a 1.500 xg e risospese in PBS 1X, quindi conservate a -80 °C.

Il giorno prima dell'infezione, 150.000 cellule RKO sono state seminate in piastre da 6 pozzetti. L'infezione è avvenuta il giorno dopo con 10 μL di virus concentrato per 24 ore. Dopo sostituzione del mezzo, le cellule sono state selezionate con puromicina (3 μg/mL, Invitrogen, #A1113803) per almeno 3 giorni. Il risultato è stato verificato con microscopia a fluorescenza (Zeiss Axio Observer Z1).

3. Risultati

3.1. Definizione di plasticità e dinamicità degli stati cellulari nella linea di cancro al seno SUM149

3.1.1. La linea di cancro al seno SUM149 è caratterizzata dalla co-esistenza di differenti stati cellulari

Per esplorare e analizzare in dettaglio la natura dinamica degli stati cellulari nelle cellule tumorali, abbiamo sfruttato il sistema descritto nell'Introduzione e in Gupta et al., 2011[1].

In particolare, la linea cellulare SUM149 presenta delle sottopopolazioni cellulari caratterizzate da specifici marcatori di superficie, che definiscono stati fenotipici distinti. Una volta isolate, queste sottopopolazioni sono in grado di tornare verso proporzioni di equilibrio nel giro di pochi giorni di coltura (**Figura 10 A**).

Le cellule SUM149 hanno un aspetto epiteliale, e tendono a aderire strettamente le une alle altre. Gupta e collaboratori [94] hanno dimostrato che le cellule SUM149 esprimono marcatori di membrana ben definiti, come EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) e CD24 (Cluster of Differentiation 24), dato confermato anche dai nostri esperimenti di immunofluorescenza (**Figura 10 C**).

EPCAM è una glicoproteina di membrana, noto marcatore epiteliale, ampiamente espresso nei carcinomi. CD24 è un'altra glicoproteina sovra espressa in quasi il 70% dei tumori umani [95] e rappresenta un indicatore di prognosi sfavorevole nei pazienti oncologici[96].

Abbiamo innanzitutto cercato di confermare l'esistenza delle tre sottopopolazioni distinte, quali cellule staminali (stem-like); luminali e basali, anche nelle nostre linee cellulari, identificate in base alla diversa espressione di EPCAM, CD24 e CD44. Abbiamo quindi utilizzato anticorpi specifici per questi marcatori di superficie e condotto analisi di citometria a flusso sull'intera popolazione.

Nella linea SUM149, abbiamo rilevato una predominanza di cellule $EPCAM^{+}$, in accordo con il fenotipo epiteliale compatto osservato in coltura 2D (**Figura 10 B**). Un piccolo sottogruppo di cellule $EPCAM^{+}$ $CD24^{+}$ $CD44^{+}$ viene solitamente descritto come popolazione simil-staminale, mentre la maggior parte delle cellule (EPCAM+ CD24+ CD44+) è tipicamente indicata come popolazione luminale. Le cellule SUM149 presentano anche una piccola popolazione $EPCAM^{-}$ $CD24^{-}$, definita basale. Nei nostri esperimenti, le proporzioni di cellule basali, simil-staminali e luminali erano rispettivamente 3,36%, 1,54% e 95,1%.

Tutte queste osservazioni risultano coerenti con quanto riportato in precedenza (Gupta et al., 2011).

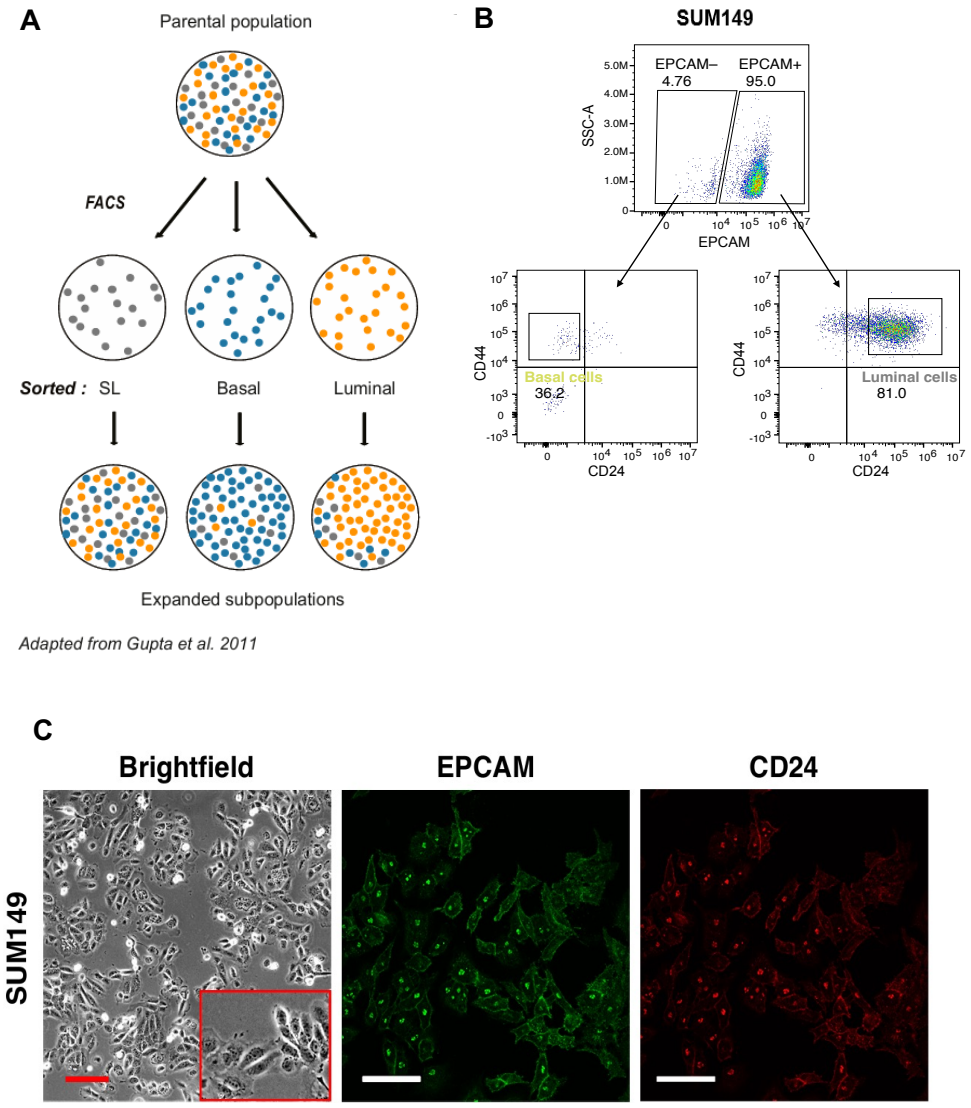


Figura 10. – ***A*** *Schema della procedura sperimentale descritta in Gupta et al, 2011, vedere il testo per ulteriori dettagli.* ***B*** *Caratterizzazione rappresentativa pseudocolore della citometria a flusso che mostra la strategia FACS utilizzata per isolare le cellule basali, staminali-simili e luminali nelle SUM149.* ***C*** *Immagini in campo chiaro (con ingrandimento 2X nell'angolo) e in immunofluorescenza che mostrano la colorazione per EPCAM e CD24 nelle cellule di SUM149 in coltura. Scalebar 100 µm.*

3.1.2. Le sottopopolazioni della linea cellulari SUM149 ristabilizza con il passare del tempo l'iniziale equilibrio fenotipico della linea parentale

È interessante notare che Gupta descrisse un modello *in silico* di tipo markoviano, ovvero la previsione di un rapido ritorno di ciascuno stato differenziato verso le proporzioni di equilibrio entro 24 ore dal sorting nelle cellule SUM149, in altre parole spiega come ogni cellula possiede una certa probabilità di passare da uno stato all'altro indipendentemente dal suo passato, ma in base solo al suo stato attuale. Nel tempo quindi, la popolazione cellulare può raggiungere un equilibrio fenotipico stabile, in cui sono presenti proporzioni costanti di cellule in ciascuno stato, e cellule simil-staminali possono emergere de novo da cellule non staminali. Partendo da tale osservazione e considerando che in seguito furono riportate poche o nessuna ulteriore evidenza biologica, abbiamo quindi deciso di definire meglio i tempi di transizione: il passaggio richiedeva davvero diversi giorni, o bastavano poche ore?

Per rispondere a questa domanda e per valutare la plasticità della linea cellulare SUM149 e la capacità delle sottopopolazioni di transitare tra diversi stati cellulari, abbiamo isolato le sottopopolazioni. A tal fine, abbiamo effettuato un ordinamento cellulare mediante citometria a flusso (flow cytometry cell sorting, FACS) e isolato cellule basali e luminali (**Figura 11 A**).

Successivamente, abbiamo piastrato ciascuna sottopopolazione e seguito l'evoluzione nel tempo, espandendo ciascuno stato di differenziazione per sei giorni in coltura. Alla fine del periodo sperimentale, abbiamo misurato le proporzioni dei diversi stati cellulari utilizzando analisi FACS sulle sottopopolazioni espanse. Inoltre, per impedire alle cellule di differenziarsi immediatamente dopo l'isolamento, tutti gli esperimenti di FACS sono stati eseguiti a 4 °C. Come riportato in (Gupta et al., 2011), abbiamo confermato che ciascuno stato cellulare isolato ristabilisce le proporzioni originali (**Figura 11 B**).

A intervalli di tempo diversi dopo il sorting — tutti entro 24 ore (0, 3, 6, 17 e 20 ore) — abbiamo valutato se le varie sottopopolazioni stessero cambiando stato, e in quali proporzioni, marcando le cellule con anticorpi anti-EPCAM, anti-CD24 e anti-CD44 (**Figura 12 A**).

In maniera sorprendente, l'esperimento time-course ha rivelato che le cellule basali purificate ristabiliscono le proporzioni della popolazione originale già entro 3 ore (**Figura 12 B**). Infatti, la percentuale di cellule basali è diminuita drasticamente entro 3 ore dal sorting, mentre si osservava un netto aumento sia delle cellule staminali-simili che, in misura ancora maggiore, delle cellule luminali. Le proporzioni degli stati cellulari venivano poi mantenute nel tempo, come nelle cellule SUM149 non purificate.

Al contrario, le cellule luminali purificate di SUM149 risultano più stabili e tendono a raggiungere le proporzioni di equilibrio attraverso la comparsa di cellule basali e staminali-simili entro 24 ore, ma con una dinamica più lenta rispetto alle cellule basali (**Figura 12 B**). Infatti, nella popolazione parentale SUM149 la percentuale di cellule luminali si mantiene intorno al ~95 ± 0,5 %, e il passaggio dal 100 % al 95 % può avvenire rapidamente, senza una drastica diminuzione delle proporzioni di stato cellulare, come invece si osserva nelle cellule basali.

Nel complesso, questi risultati indicano che le sottopopolazioni all'interno delle linee cellulari tumorali sono altamente plastiche e tendono a transitare da uno stato cellulare all'altro, al fine di ristabilire le proporzioni fenotipiche originali una volta isolate e poste in coltura.

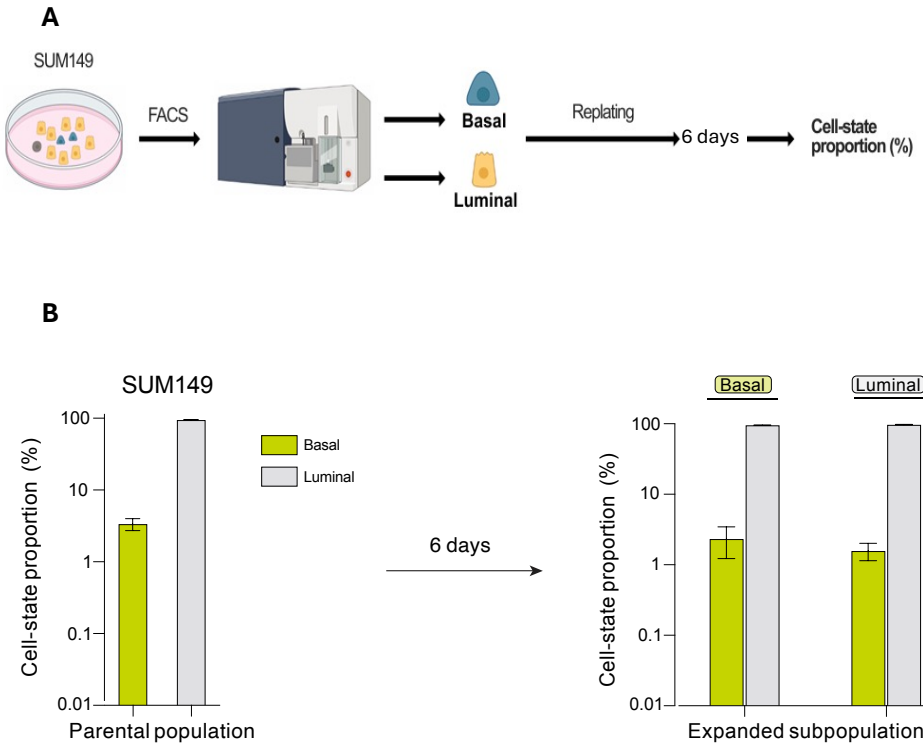


Figura 11. ***A*** *Schema della procedura sperimentale. Vedere il testo per ulteriori dettagli.* ***B*** *Diagramma a barre dall'analisi FACS sulle sottopopolazioni espanse che confermano il ritorno alle proporzioni fenotipiche in SUM149, rappresentati con deviazione standard (SD), n = 3.*

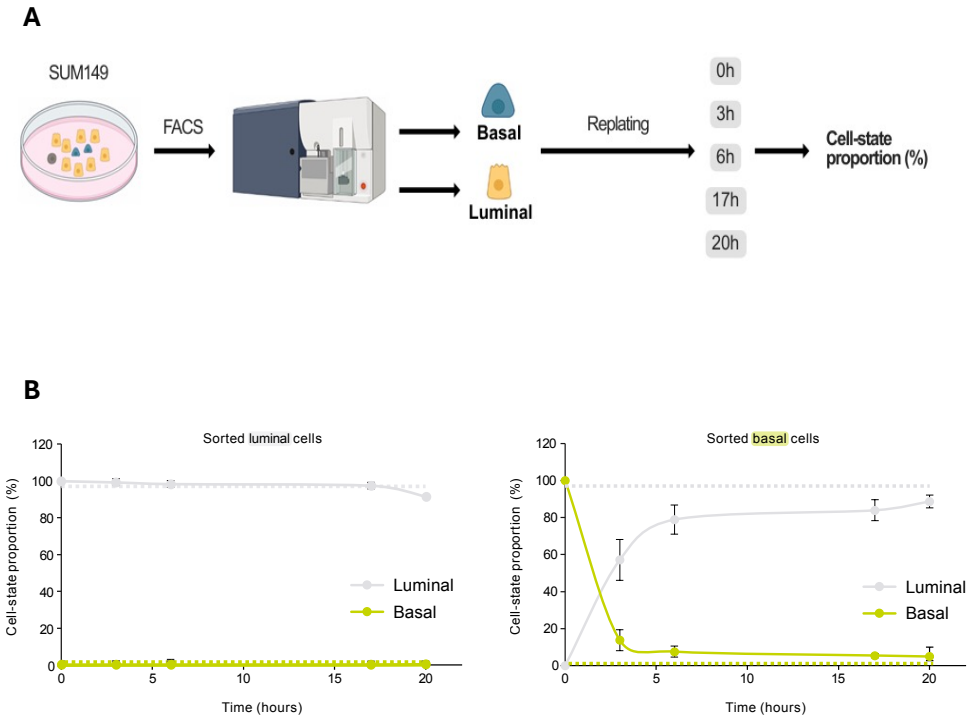


Figura 12. ***A*** *Schema della procedura sperimentale. Vedere il testo per ulteriori dettagli.* ***B*** *Analisi FACS da esperimenti a corsa temporale sulle sottopopolazioni separate che mostrano la cinetica del ritorno alle proporzioni originali degli stati cellulari nelle cellule basali (a sinistra) e luminali (a destra). Le linee tratteggiate rappresentano la percentuale dei livelli allo stato stazionario di cellule luminali, basali e staminali-simili nella linea cellulare parentale non separata. I dati sono rappresentati con deviazione standard (SD), n = 3.*

3.2. Le sottopopolazioni delle linee cellulari di cancro al seno possono essere stimolate a spostarsi tra di loro

3.2.1. Generazione dei reporter per la linea cellulare SUM149

Una volta definito che le sottopopolazioni della linea cellulare SUM149 fossero in grado con il tempo di ristabilire la condizioni iniziali della linea parentale, per indagarne la plasticità fenotipica e per capire se le percentuali delle sottopopolazioni fossero in grado di spostarsi tra loro se stimolate, le SUM 149 sono state anzitutto marcate.

In particolare, è stata effettuata una marcatura duale mediante vettori di espressione ingegnerizzati specifici per la fenotipizzazione delle due sottopopolazioni (basale e luminale). La sottopopolazione mesenchimale (basale) è stata marcata con mKATE2 sotto il promotore della vimentina (**Figura 13 A**), mentre quella epiteliale (luminale) con eGFP sotto il promotore della claudina (**Figura 13 B**), costruiti considerando il livello di espressione relativo di mRNA dei due marcatori nelle specifiche popolazioni associate (**Figura 13C**), in ultimo entrambi associati a promotore costitutivo CMV per la resistenza antibiotica: Puromicina per uno e Hygromicina per l'altro (**Figura 13 D**).

Questa scelta ha consentito di quantificare e seguire le due sottopopolazioni distintamente all'interno della stessa linea cellulare, permettendo il monitoraggio dinamico delle variazioni di percentuali delle due popolazioni.

A

BASAL VS Luminal

Gene Name	Log_2FC	*Adj. p-value*	Cell-state	Reference
ZEB1	6.859267771	1.04E-09	Basal	Eger et al. 2005
FGFR1	4.510879075	2.63E-08	Basal	Shipitsin et al. 2007
ZEB2	4.030739607	6.14E-07	Basal	Vandewalle et al. 2005
VIM	4.025217871	1.40E-06	Basal	Shipitsin et al. 2007
SNAI2	1.61489338	0.000389521	Basal	Gudjonsson et al. 2002
ITGB4	2.298657903	0.000657842	Basal	Lu et al. 2008
CDH2	1.984090353	0.001247682	Basal	Gudjonsson et al. 2002

B

LUMINAL VS Basal

Gene Name	Log_2FC	*Adj. p-value*	Cell-state	Reference
EPCAM	5.115309663	9.99E-07	Luminal	Gudjonsson et al. 2002
CLDN7	5.52090789	9.99E-07	Luminal	Blackman et al. 2005
SFRP1	4.645055569	1.79E-07	Luminal	Shipitsin et al. 2007
ERBB3	3.091082321	1.63E-06	Luminal	Jones et al. 2004
CDH1	4.994021294	1.11E-06	Luminal	Gudjonsson et al. 2002
KRT19	5.942801357	1.10E-06	Luminal	Gudjonsson et al. 2002
KRT8	2.262053132	9.01E-05	Luminal	Shipitsin et al. 2007

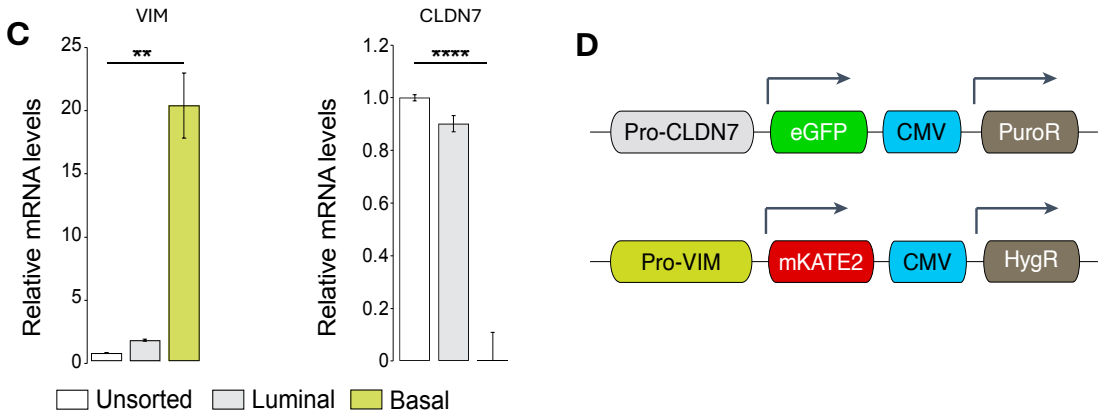


Figura 13. ***A-B*** *Rappresentazione schematica dei geni marker distintivi per fenotipi luminali e basali nelle linee cellulari SUM149, con relativi valori di espressione (Log_2FC) e significatività statistica (Adj. p-value).* ***C*** *Analisi dell'espressione di vimentina (VIM) e claudina-7 (CLDN7) mediante qPCR evidenziando l'elevata espressione di VIM nella popolazione basale e di CLDN7 in quella luminale* ***D*** *Schema dei costrutti vettoriali utilizzati per la marcatura: promotore CLDN7 a monte*

di eGFP per cellule epiteliali, e promotore VIM a monte di mKATE2 per cellule mesenchimali, entrambi associati a promotore costitutivo CMV per la resistenza antibiotica (PuroR o HygR).

3.2.2. Test farmacologico di fattori induttori dell'EMT sulle linee cellulari SUM149 e MCF7

Nel contesto della mia tesi, incentrata sullo studio della plasticità cellulare e della capacità delle cellule tumorali di transitare tra stati epiteliali e mesenchimali, ho impiegato un approccio di perturbazione mediante citochine e composti chimici mirato a modulare questo equilibrio dinamico. Oltre a diversi trattamenti sperimentali preposti a potenziare attività pro-EMT, ho selezionato specifiche condizioni in grado di stimolare in maniera robusta tale processo, basandomi su evidenze scientifiche ben consolidate in letteratura.

In particolare, il primo test utilizzato include il trattamento con due citochine, TGF-β (Transforming growth factor beta) e TNF-α (Tumor necrosis factor α). Questi fattori sono spesso utilizzati, singolarmente o in combinazione, per promuovere l'EMT in diversi sistemi sperimentali e soprattutto la quale funzionalità e efficacia è stata ampiamente testata nel modello di base da me utilizzato: il carcinoma mammario[97,98]. La capacità di induzione dell'EMT è data dalla relativa capacità di queste citochine di attivare specifici pathway associati a questo processo, in particolare TGF-β esercita il suo effetto attraverso l'attivazione della via Smad2/3, che promuove la trascrizione di geni mesenchimali e la repressione di marker epiteliali, ma può anche coinvolgere proteine non-Smad come MAPK, PI3K/AKT e Rho GTPasi, influenzando la migrazione[99]. TNF-α, invece, attiva prevalentemente la via NF-κB e la proteina chinasi TAK1, contribuendo alla stabilizzazione di fattori trascrizionali pro-EMT quali Snail e Twist e cooperando con TGF-β nel rinforzare la transizione[100–102]. La combinazione di TGF-β e TNF-α è stata riportata come particolarmente efficace nel superare resistenze intrinseche all'EMT in linee cellulari di cancro alla mammella, inducendo modificazioni fenotipiche visibili[103].

In questo disegno sperimentale, associato a delineare la capacità plastica delle linee cellulari, ne ho utilizzate due: le SUM149 e le MCF7. Le SUM149 costituiscono la linea base dello studio, mentre le MCF7 sono state principalmente impiegate come controllo positivo per l'induzione dell'EMT, alla luce di studi che ne documentano la responsività a stimoli pro-EMT, soprattutto in presenza di co-trattamento TGF-β/TNF-α[104] . In

particolare, come già sopra anticipato, nelle MCF7 ho testato un range di concentrazioni di TNF-α (20, 40, 100, 200 e 2000 ng/mL) e di TGF-β (40, 80 e 160 ng/mL), oltre alle rispettive combinazioni, condizioni che sono state testate con due tempistiche di trattamento: 24 e 48 ore; le cellule sono state poi analizzate tramite citometria a flusso (FACS) utilizzando come marcatore di superficie EPCAM(**Figura 14 A**), un indicatore consolidato dello stato epiteliale che risulta fortemente espresso in questo tipo di cellule, la quale espressione tende tipicamente a ridursi durante EMT. Studi su SUM149 e MCF7 hanno già dimostrato che è possibile separare popolazioni $EpCAM^{+}$ da $EpCAM^{-}$, le quali differiscono nei loro profili fenotipici [105]. Inoltre, la regolazione dinamica di EPCAM durante EMT è stata ben documentata, definendo che la sua espressione, viene modulata da EMT-TF (transcription factors) [106]. Per queste ragioni, EPCAM è stato scelto come indicatore principale per distinguere gli stati cellulari nelle SUM149 e nelle MCF7. Contrariamente alle evidenze riportate in letteratura però, la maggior parte dei trattamenti non ha indotto un evidente spostamento fenotipico in nessuno dei tempi utilizzati per il trattamento (**Figura 14 B-C**).

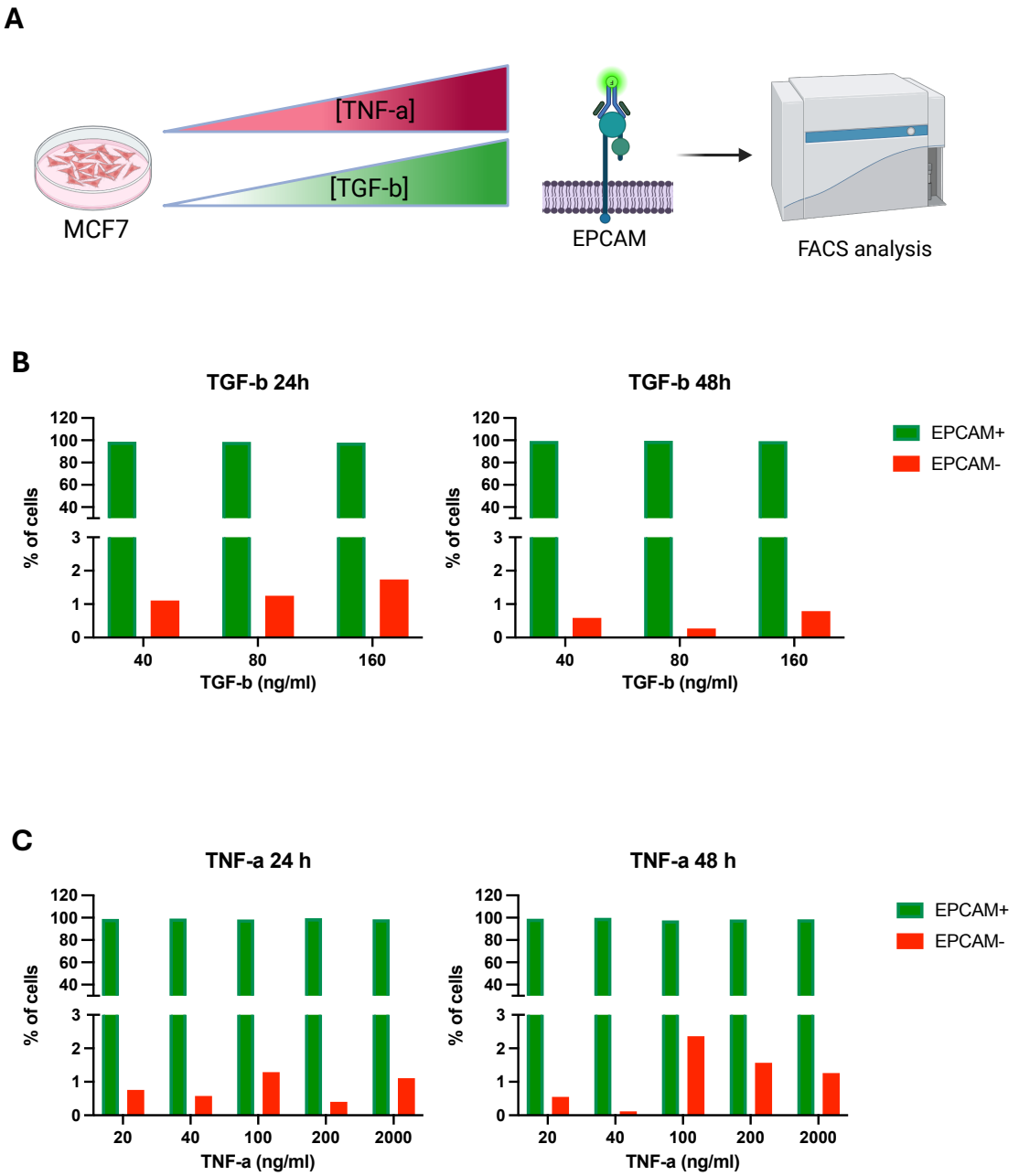


Figura 14. ***A*** *Schema riassuntivo del trattamento delle MCF7 incubate per 24 h o 48 h con concentrazioni crescenti di TGF-β e TNF-α.*

B *Grafici a barre che mostrano la variazione di espressione di EPCAM in cellule MCF7 trattate per 24 h e 48 h con concentrazioni crescenti di TGF-β. I colori indicano lo stato di espressione del marker EPCAM: verde (cellule positive), rosso (cellule negative).* ***C*** *Grafici a barre che mostrano la variazione degli stessi parametri di Figura B, ma in cellule MCF7 trattate per 24 h e 48 h con concentrazioni crescenti di TNF-α. I colori mantengono la stessa codifica della Figura B. L'asse delle y dei due pannelli B e C mostrano una scala interrotta per apprezzare meglio le differenze numeriche delle percentuali cellulari*

Nella linea SUM149 che, come detto sopra, è stata marcata stabilmente con reporter genetici (mKATE2 per la popolazione mesenchimale e eGFP per la popolazione epiteliale), ho invece adottato un approccio di monitoraggio dinamico tramite time-course di 120 ore, analizzandolo tramite l'incucyte (**Figura 15 A**). In questo caso, le cellule sono state trattate con concentrazioni singole di TNF-α (20 ng/ml), TGF-β (40 ng/ml) e la loro combinazione seguendo un approccio basato su evidenze scientifiche. Per quanto riguarda il TGF-β, sebbene la letteratura riporti frequentemente l'uso di concentrazioni più basse di quelle da me utilizzate (tra 10 e 20 ng/ml) per stimolazioni prolungate e più graduali e per ottenere una risposta più marcata nel breve-medio termine è stata preferita una concentrazione di 40 ng/ml, utile in contesti sperimentali con tempi limitati[107]. La scelta della concentrazione di TNF- α è invece basata su precedenti lavori che hanno dimostrato come 20 ng/ml di TNF-α siano sufficienti a indurre risposte fenotipiche misurabili in cellule come le SUM149 o le MCF-7 (ad esempio aumento della migrazione o espressione di marcatori di EMT) [108]. In ultimo l'utilizzo combinato delle due citochine si basa su studi che mostrano come questi fattori, anche se non sempre sinergici in senso stretto, possano agire in modo cumulativo nel promuovere l'EMT o risposte correlate, rafforzando l'effetto induttivo complessivo[109]. Le variazioni fenotipiche sono state quantificate in tempo reale, tramite una conta assistita dall'intelligenza artificiale per determinare i contorni delle cellule presenti nel campo di analisi, permettendo di osservare in maniera diretta la modulazione delle sottopopolazioni indotta dagli stimoli, confrontandole con il controllo non trattato (**Figura 15 B**). Anche in questo caso il trattamento non ha portato a nessuna evidente differenza rispetto alla condizione non trattata (**Figura 15 C**).

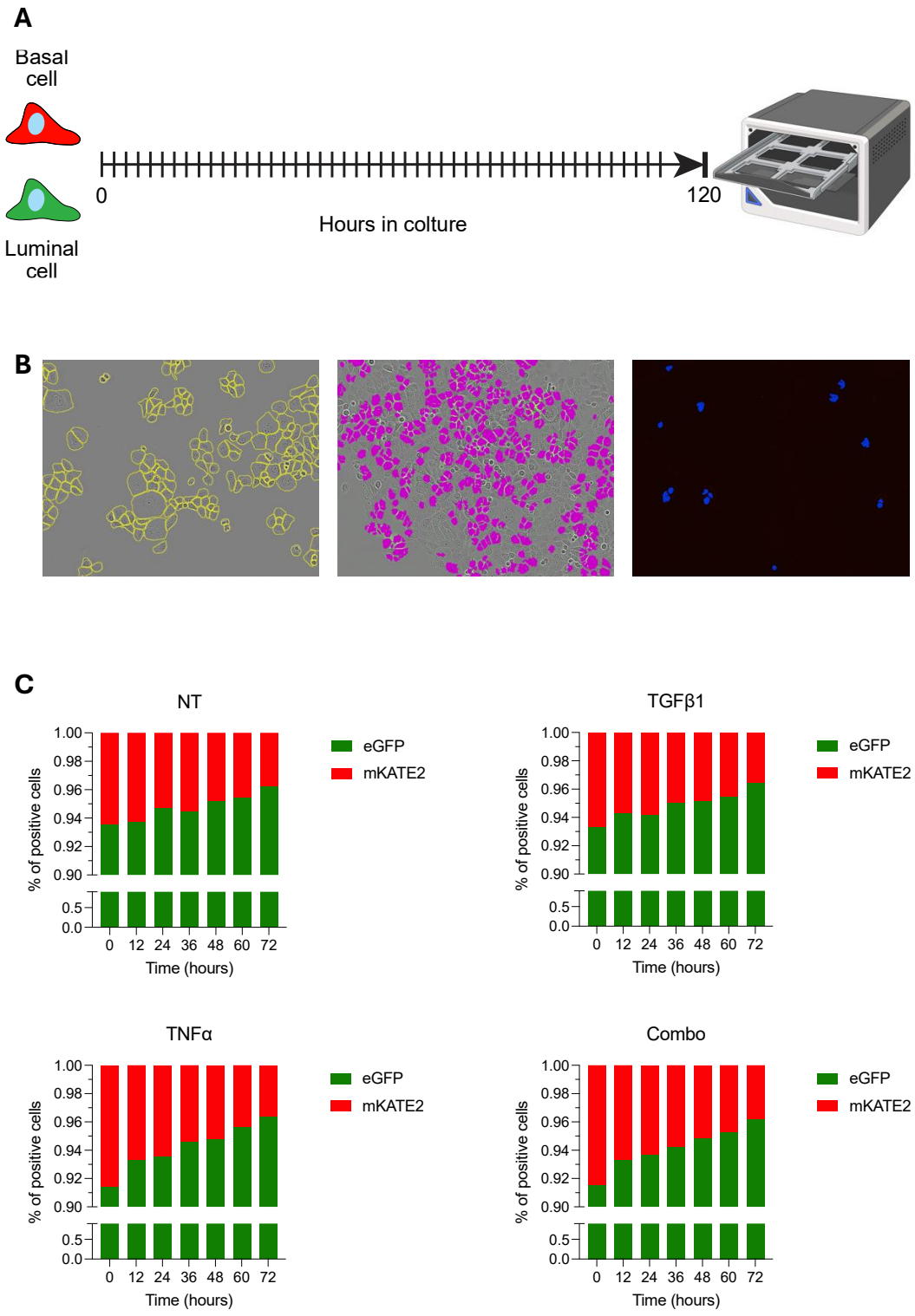


***Figura 15**. **A** Schema riassuntivo del trattamento delle SUM149 incubate per 120 h e analizzate tramite incucyte. Gli assi indicano le differenti concentrazioni del trattamento e il quantitativo di cellule espresso in percentuali. **B** Immagini rappresentative della conta*

basata sull'intelligenza artificiale atte a delineare i contorni delle cellule presenti nel campo: il giallo indica i contorni cellulari, il viola le cellule luminali, il blu cellule basali. ***C*** *Grafici a barre che mostrano la variazione di espressione di EPCAM in cellule SUM149. Gli assi indicano le percentuali cellulari considerando i colori delle barre: verde (cellule positive), rosso (cellule negative); e i vari tempi di acquisizione*

Dopo aver valutato la modulazione dell'EMT in MCF7 e SUM149 mediante stimolazione con TGF-β e TNF-α, è stato intrapreso un nuovo approccio focalizzato sulla via di segnalazione mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Questa via è un nodo centrale nel controllo della crescita e del metabolismo cellulare e risulta frequentemente iperattivata nel carcinoma mammario, in particolare nei sottotipi aggressivi[110]. Numerosi studi hanno dimostrato che l'attivazione di mTOR non solo promuove proliferazione e sopravvivenza, ma può anche contribuire alla transizione epitelio-mesenchimale, in parte modulando l'attività di fattori trascrizionali EMT-inducenti.

Sulla base di queste evidenze, l'impiego di inibitori specifici della via mTOR, come temsyrolimus e rapamicina, è stato utilizzato per verificare se la soppressione farmacologica di questa segnalazione fosse in grado di modulare lo stato fenotipico delle cellule e influenzarne la capacità di transizione EMT. Tale approccio consente di esplorare non solo l'impatto di mTOR sulla plasticità cellulare, ma anche di valutare la possibilità che il pathway rappresenti un punto di vulnerabilità terapeutica per interferire con i processi di progressione tumorale[111]. In particolare, sugli inibitori del pathway di mTOR, ovvero i rapalogs: temsyrolimus e rapamicina, il quale effetto è stato testato da me esclusivamente sulle cellule SUM149, e la cui analisi è stata condotta dopo 72 ore di trattamento misurando i livelli di espressione del marker di superficie EPCAM mediante analisi FACS.

Nello specifico le cellule sono state trattate con temsyrolimus 15 μM, in quanto si è visto che, in vitro, il temsyrolimus a concentrazioni micromolari (fra 10 e 15 μM) può bloccare efficacemente l'attività di mTOR, inducendo un forte calo nella sintesi proteica globale e una rapida attivazione dei fattori di traduzione eEF2 e eIF2A[112].

Mentre la Rapamicina è stata utilizzata con una concentrazione di 5 μM; specificatamente questa concentrazione è stata scelta considerando che, benché in molte linee di carcinoma mammario dosaggi nanomolari (es. 20–50 nM) risultino sufficienti a definire una risposta, linee più aggressive o meno sensibili richiedono concentrazioni significativamente più elevate. In alcuni studi, infatti, linee triple negative come le SUM149 evidenziano risposte meno pronunciate, suggerendo la necessità di concentrazioni maggiori, mostrando una variabilità di risposta al trattamento[113] .

Nonostante le concentrazioni scelte (15 μM temsyrolimus e 5 μM rapamicina) siano compatibili con studi precedenti in cellule mammarie, in questa linea cellulare (SUM149), come si può osservare in figura dai dati emersi tramite analisi FACS (**Figura 16A**), non vi è alcuna variazione visibile nel livello di espressione di EPCAM rispetto ai controlli non trattati, con distribuzione e intensità del segnale rimaste invariate (**Figura 16 B**).

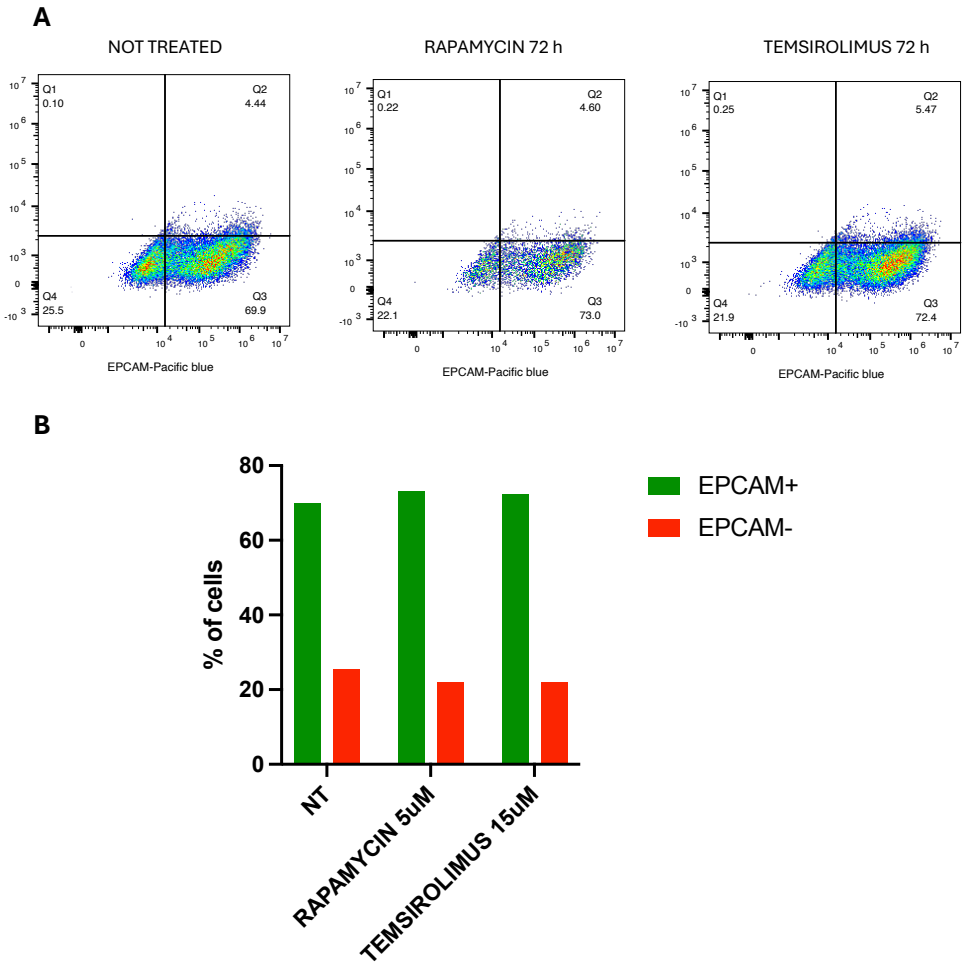


***Figura 16**. **A** Plot citofluorimetrici rappresentativi dell'espressione di superficie di EPCAM nelle cellule SUM149 dopo 72 h di trattamento. Il controllo non trattato (NT) mostra una popolazione maggioritaria di cellule EPCAM$^+$ e una componente di cellule EPCAM$^-$ inferiore; i trattamenti con rapamicina e temsyrolimus (pannelli adiacenti) non evidenziano alcuna variazione nella distribuzione né nell'intensità del segnale EPCAM rispetto al controllo. **B** barplot rappresentativo delle condizioni sopra menzionate.*

Un'ulteriore strategia messa in atto per valutare la possibilità di indurre artificialmente uno spostamento delle percentuali delle popolazioni, associato all'EMT è stata quella di utilizzare la verteporfina, un composto porfirinico inizialmente sviluppato come agente fotosensibilizzante, ma che negli ultimi anni si è rivelato un potente inibitore del pathway YAP/TAZ [114] (**Figura 17 A**). La via YAP/TAZ riveste un ruolo centrale nel controllo della

meccano-trasduzione e della plasticità cellulare e, in contesti tumorali, è stata direttamente correlata alla transizione epitelio-mesenchimale, alla staminalità e a un maggiore potenziale invasivo[115,116]. Diversi studi in cellule di carcinoma mammario hanno dimostrato che l'inibizione farmacologica di YAP/TAZ mediante verteporfina può indurre un marcato rimodellamento del fenotipo cellulare, accompagnato da variazioni nell'espressione di marcatori di EMT come EPCAM, CD44 e N-caderina a favore di uno stato mesenchimale [117,118].

Sulla base di queste evidenze, la verteporfina è stata testata sia sulla linea SUM149, impiegata fino a questo punto come modello principale, sia sulla linea MDA-MB-468. Le cellule sono state trattate con verteporfina per valutare se l'inibizione di YAP/TAZ fosse in grado di favorire una transizione verso stati più mesenchimali, comportamento visibile tramite l'alterazione dell'espressione del marcatore di superficie EPCAM.
In netto contrasto con quanto osservato nei precedenti esperimenti farmacologici (rapamicina; temsyrolimus; TGF-b e TNF-a), la verteporfina ha prodotto un effetto estremamente marcato, determinando una riduzione consistente della popolazione $EPCAM^+$ in entrambe le linee cellulari e mostrando dunque una straordinaria efficacia nel promuovere uno shift fenotipico mesenchimale (**Figura 17 B-C**). Questo risultato conferma da un lato il ruolo della via YAP/TAZ nel mantenimento del fenotipo epiteliale e, dall'altro, suggerisce che l'inibizione di tale pathway possa rappresentare una strategia altamente efficace per modulare la plasticità cellulare in modelli di carcinoma mammario.

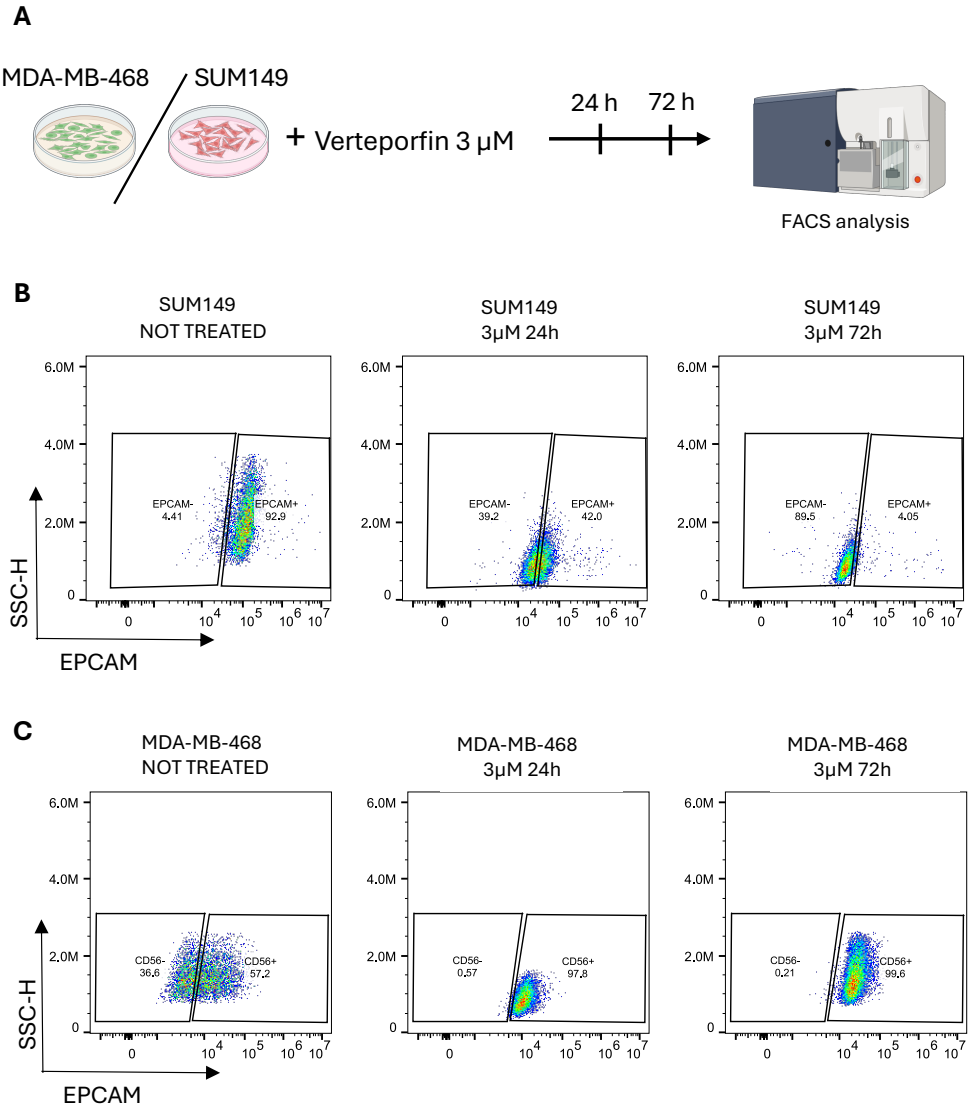


***Figura 17**. **A** Schema sperimentale del trattamento con Verteporfina 3 µM sulle linee cellulari tumorali MDA-MB-468 e SUM149 per 24 e 72 ore. **B** Dotplot dell'analisi FACS sulla linea SUM149: espressione del marcatore EPCAM nei campioni non trattati, trattati per 24 ore e trattati per 72 ore. **C** Dotplot dell'analisi FACS della linea MDA-MB-468: espressione del marcatore CD56 nel campione non trattato, trattato per 24 ore e per 72 ore.*

L'ultima condizione sperimentale da me analizzata, con l'obiettivo di valutare se specifici stimoli ambientali fossero in grado di promuovere uno spostamento fenotipico compatibile con un innesco di EMT, è stata l'esposizione delle due linee cellulari SUM 149 e MCF7 ad un ambiente ipossico.

L'ipossia rappresenta infatti una componente fisiopatologica tipica dei tumori solidi in fase avanzata, legata all'inefficiente vascolarizzazione e alla progressiva espansione della massa tumorale. È noto che in tali condizioni la stabilizzazione del fattore trascrizionale HIF-1α può indurre un profondo rimodellamento metabolico e, in alcuni contesti, favorire un incremento della plasticità cellulare con deregolazione di marcatori di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) [119,120] .

Per testare questo aspetto, sia le cellule SUM149 sia le MCF7 (queste ultime utilizzate come linea di controllo positivo,) sono state mantenute per circa dieci giorni in un incubatore ad ambiente ipossico e analizzate in corrispondenza di ciascun passaggio cellulare mediante FACS utilizzando come marcatore di superficie sempre EPCAM.

In parallelo, cellule mantenute in incubatore in condizioni di normossia sono state usate come controllo, mantenendo le cellule nelle medesime condizioni (tempo totale di trattamento e numero di passaggi), al fine di escludere che eventuali modificazioni fossero correlate semplicemente a differenze di crescita in vitro.

Nonostante in letteratura siano stati descritti casi in cui l'ipossia contribuisce all'acquisizione di caratteristiche più mesenchimali e invasive nelle cellule di carcinoma mammario[121,122], nei nostri modelli sperimentali non è stata osservata alcuna variazione apprezzabile nell'espressione di EPCAM. In particolare, in entrambi i modelli cellulari, la distribuzione del segnale di EPCAM al FACS rimane sovrapponibile a quella delle condizioni normossiche in tutti i punti temporali analizzati, suggerendo che la sola ipossia non è sufficiente a modularne il fenotipo (almeno non nelle condizioni qui testate) (**Figura 18 A-B**).

È opportuno sottolineare che, sebbene il protocollo sia stato impostato per riprodurre il più fedelmente possibile una condizione ipossica prolungata, una completa e continua esposizione a bassi livelli di O_2 non può essere garantita durante i passaggi, poiché in quei brevi intervalli le cellule vengono necessariamente trasferite in ambiente normossico per consentire la raccolta e il re-seeding (sub-cultura). Tuttavia, considerando che le cellule vengono riposizionate immediatamente nell'incubatore ipossico e che l'analisi è stata eseguita in modo sistematico in tutte le fasi, i risultati ottenuti possono comunque essere considerati attendibili e indicativi dell'effettiva risposta cellulare in condizioni ipossiche prolungate.

Nel complesso, questi dati suggeriscono che, a differenza di quanto riportato in altri contesti tumorali[123,124], né le SUM149, né le MCF7 mostrano un cambiamento di espressione di EPCAM in seguito all'esposizione ipossica per dieci giorni, indicando che una modifica fenotipica eventualmente legata all'EMT richiede probabilmente ulteriori stimoli cooperanti o tempi di esposizione più protratti.

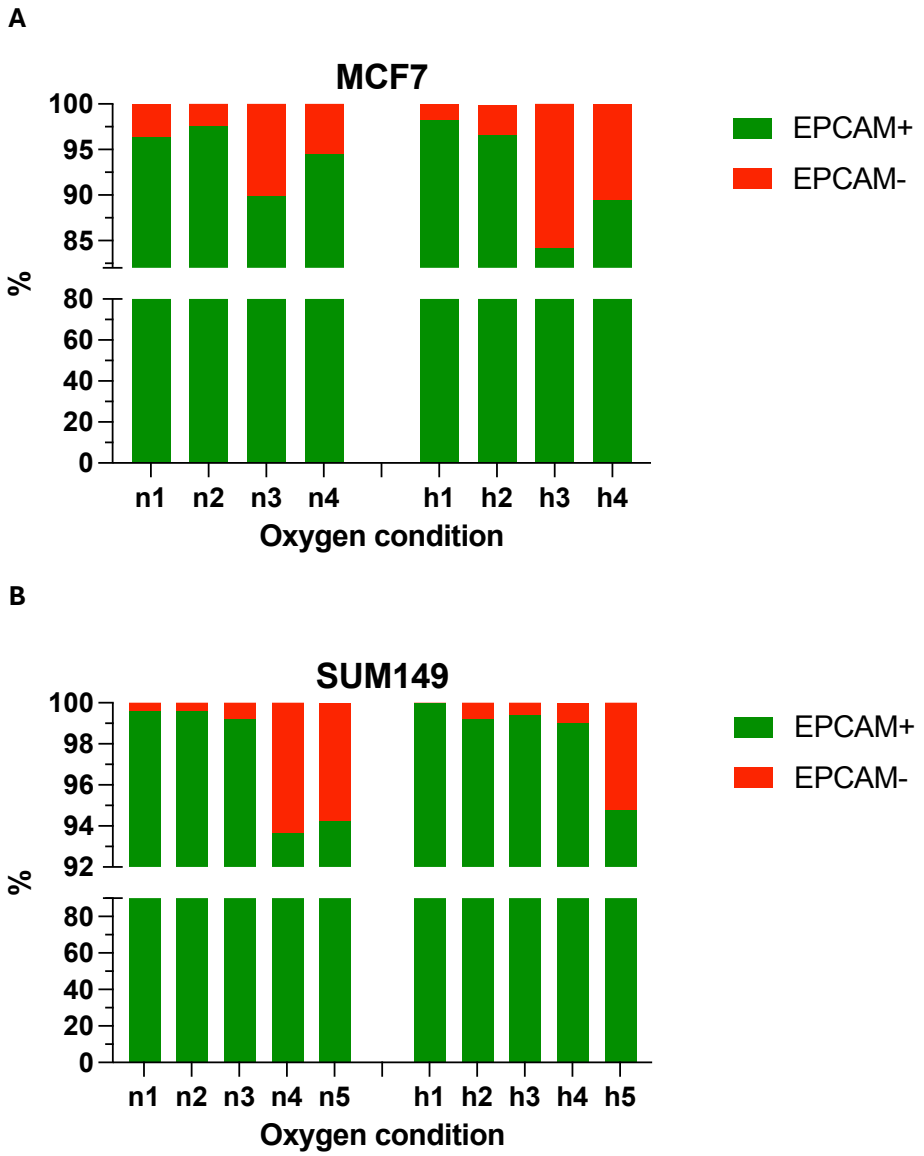


Figura 18. **A** Barplot rappresentativi della percentuale di cellule MCF7 EPCAM^{+} (verde) ed EPCAM^{-} (rosso) analizzate mediante FACS. Le cellule sono state mantenute in condizioni normossiche (n) o ipossiche (h), e analizzate in corrispondenza di ogni passaggio cellulare. I numeri (1–4) indicano l'ordine temporale delle analisi eseguite durante il periodo sperimentale (per un totale di 4 passaggi e dieci giorni di coltura).

B Stessa analisi effettuata sulla linea cellulare SUM149, con le medesime condizioni e convenzioni (n = normossia, h = ipossia; numeri = passaggi cellulari successivi)

3.3. Definizione di plasticità e dinamicità degli stati cellulari in altre linee di cancro al seno, l'eterogeneità cellulare è una caratteristica comune tra le linee di cancro al seno

3.3.1. Caratterizzazione dell'eterogeneità fenotipica delle linee cellulari di cancro al seno MDA-MB-436; HCC-1937 e MAD-MB-468 con identificazione di eterogeneità fenotipica nella linea cellulare MDA-MB-468 al marcatore di superficie CD56 (NCAM)

Considerando i risultati ottenuti nei capitoli precedenti, abbiamo pensato di estendere l'analisi ad altri sistemi cellulari, con lo scopo di comprendere se la plasticità fenotipica rappresentasse una caratteristica specifica della linea SUM149 o al contrario, una proprietà più ampia e condivisa anche da altre linee di carcinoma mammario.

In letteratura è ormai consolidato che la dinamicità degli stati cellulari rappresenta un tratto distintivo del tumore al seno[125,126], e che le cellule tumorali possono spostarsi lungo un continuum epitelio–mesenchimale, modulando in modo reversibile l'espressione di determinati marcatori di superficie[127]. Tuttavia, i risultati ottenuti sulla linea SUM149 hanno evidenziato che, pur essendo un modello fisiologicamente molto rilevante e studiato, essa presenta un fenotipo estremamente stabile, ovvero mantiene in maniera costante e predominante caratteristiche epiteliali, senza mostrare fluttuazioni significative o spontanee verso stati alternativi, rendendo complesso valutare eventuali transizioni fenotipiche di tipo mesenchimale in risposta a stimoli sperimentali.

Per questo motivo si è deciso di estendere l'analisi ad altre linee di carcinoma mammario, con l'obiettivo di caratterizzare il grado di eterogeneità fenotipica e individuare modelli cellulari dotati di una maggiore propensione alla plasticità, ossia capaci di modificare il proprio stato tra fenotipi epiteliali e mesenchimali in risposta a stimoli esterni o a condizioni micro-ambientali differenti, che possano rappresentare sistemi sperimentali più adatti allo studio della transizione epitelio-mesenchimale in vitro.

In particolare, sono state selezionate tre linee di cancro al seno triplo negative ampiamente utilizzate nella ricerca in ambito preclinico: MDA-MB-436, HCC-1937 e MDA-MB-468

rappresentative di sottotipi molecolari diversi e documentate in letteratura per presentare popolazioni cellulari con gradi differenti di EMT e staminalità[128,129].

Ciascuna linea cellulare è stata analizzata mediante citofluorimetria per l'espressione di un pannello di marcatori di superficie collegati a transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e plasticità cellulare: EPCAM, CD44, CD24, CD56, PDGFR-α, CD49f e CD104[128] (**Figura 19**). EPCAM è una molecola di adesione epiteliale (da noi già utilizzata) che viene tipicamente espressa in cellule con caratteristiche epiteliali e la sua non espressione è associata allo stato EMT[133]; CD44 è un marcatore frequentemente usato per identificare cellule staminali-simili e legate a capacità migratorie/invasive CD24 è un marker proteico che tende a ridursi durante l'EMT e nelle cellule staminali-simili[134]; CD56 (NCAM) è associato a interazioni cellula-cellula e la sua espressione aberrante nei tumori solidi è stata associata a proprietà migratorie e invasive, rendendolo un marker utile per studiare processi legati all'EMT[135]; PDGFR-α (platelet-derived growth factor) è un recettore per fattori di crescita e la sua espressione definisce capacità di motilità, invasività e sopravvivenza in contesto tumorale[136]; CD49f (integrina α6) è un marcatore implicato nell'adesione alla matrice extracellulare e nella definizione di sottopopolazioni basali o progenitrici nell'epitelio mammario[129]; CD104 (β4 integrina) partecipa anch'essa alle interazioni con la matrice e alle giunzioni emidesmosomiali, ed è spesso usata per caratterizzare stati differenziati o intermedi all'interno della gerarchia delle cellule tumorali[137].

Questa strategia ha permesso di evidenziare l'eterogeneità che caratterizza le diverse linee tumorali analizzate, e di definirne in modo più preciso il profilo fenotipico. La caratterizzazione mediante pannelli multipli di marcatori rappresenta infatti un passaggio fondamentale nello studio della plasticità cellulare: permette di distinguere le linee che presentano un fenotipo rigidamente epiteliale o rigidamente mesenchimale da quelle che, invece, mostrano una distribuzione intermedia dei marcatori. Quest'ultimo gruppo è di particolare interesse, poiché un assetto "ibrido" o intermedio è spesso associato a una maggiore capacità di transizione dinamica tra stati cellulari distinti.

In questo contesto, linee caratterizzate da un profilo fenotipico fortemente omogeneo risultano meno adatte a indagare i meccanismi di riconversione, poiché tendono a mantenere stabilmente il proprio stato di partenza, riducendo la possibilità di osservare variazioni significative in risposta a stimoli sperimentali. Al contrario, le linee con una

distribuzione eterogenea o bilanciata dei marcatori analizzati rappresentano modelli sperimentali ideali per studiare i fenomeni di plasticità dinamica, in quanto più predisposte a oscillare tra stati diversi e a ricapitolare la complessità funzionale delle popolazioni tumorali.

In questo modo è stato possibile definire una base sperimentale più solida per valutare, come descriverò nei risultati successivi, se e in che misura specifici stimoli siano in grado di spingere tali linee a muoversi all'interno del continuum epitelio-mesenchimale.

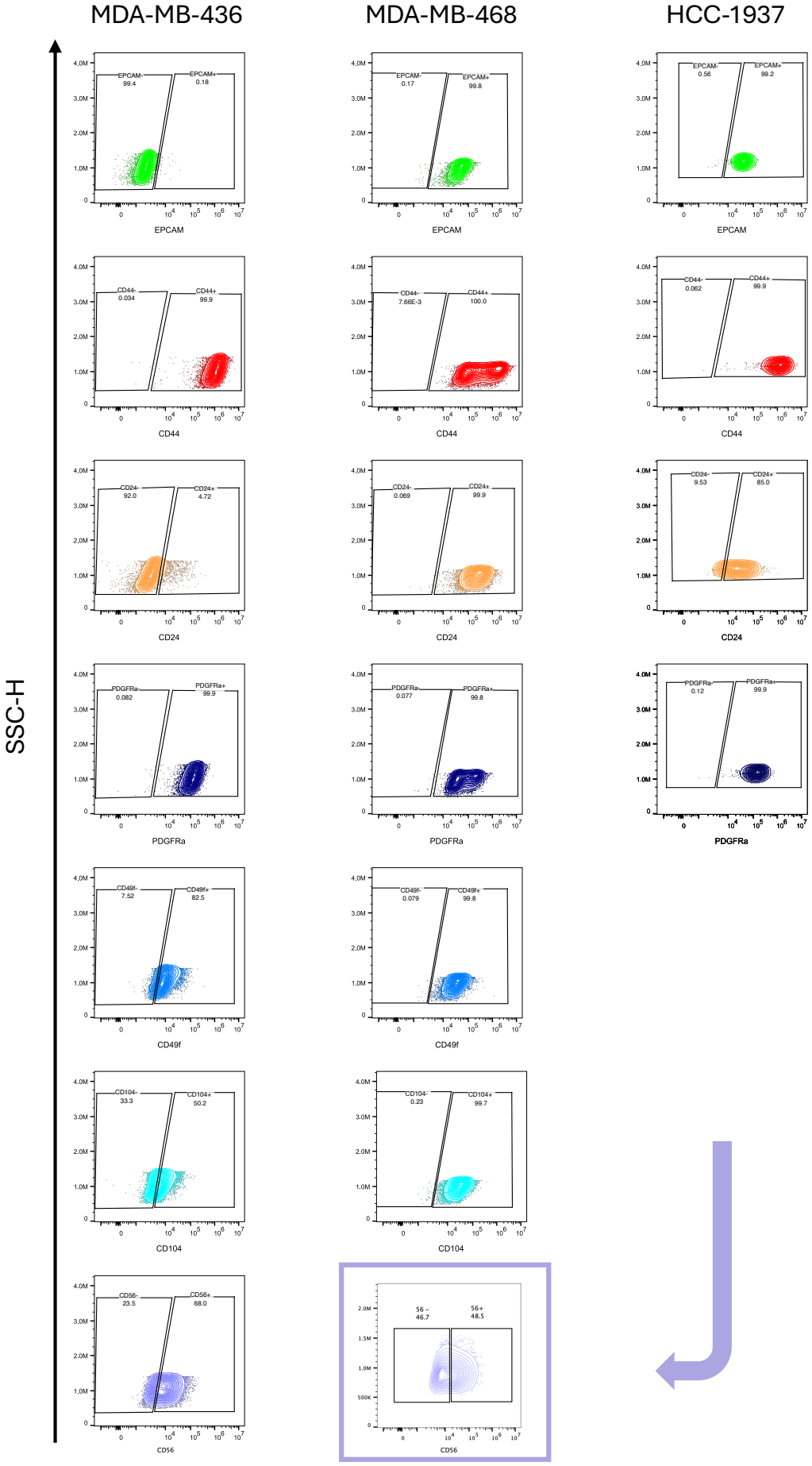

MDA-MB-436
MDA-MB-468
HCC-1937
SSC-H
EPCAM
CD44
CD24
PDGFRa
CD49f
CD104
CD56

***Figura 19**. Pannelli di caratterizzazione delle due linee cellulari: MDA-MB-436; MDA-MB-468 per i marker di superficie: EPCAM; CD44; CD24; PDGFR-α; CD49f; CD104; CD56; e della linea HCC-1937 per i marker di superficie: EPCAM; CD44; CD24; PDGFR-α. In evidenza l'ultimo Dotplot di caratterizzazione con il CD56, marcatore eterogeneo nelle MDA-MB-468*

La caratterizzazione mediante pannelli multipli di marcatori rappresenta un passaggio fondamentale nello studio della plasticità cellulare; infatti, permette di distinguere le linee che presentano un fenotipo rigidamente epiteliale o rigidamente mesenchimale da quelle che, invece, mostrano una distribuzione intermedia dei marcatori.

Nello screening abbiamo osservato che, per alcuni marcatori e linee cellulari, le differenze riscontrate si traducevano principalmente in variazioni di intensità di espressione: "high" e "low" (PDGFR- alpha; CD44), senza però una netta separazione tra cellule positive e negative (epiteliali e mesenchimali) (**Figura 19**). Questo tipo di eterogeneità quantitativa, pur informativa, risulta meno adatta per indagare la plasticità dinamica, poiché non consente di distinguere sottopopolazioni funzionalmente opposte e di seguirne l'eventuale inter-conversione. Al contrario, la presenza di due popolazioni chiaramente separate, una positiva e una negativa, fornisce un modello sperimentale più potente per lo studio della transizione tra stati cellulari distinti. In questo contesto, la linea di cancro al seno triplo negativa MDA-MB-468 per CD56 rappresenta l'esempio più rappresentativo in quanto l'unica ad aver mostrato una distribuzione bimodale ben definita, con due sottopopolazioni eterogenee fenotipicamente rispetto al marcatore di superficie CD56 (NCAM).

Le analisi FACS hanno rivelato quindi una suddivisione quasi perfettamente equa tra le cellule CD56-positive (48,5%), e quelle CD56-negative (46,7%) (**Figura 19**), configurando un pattern netto e ben distinto (quindi approssimativamente definite da un rapporto 50/50). Questo profilo suggerisce la presenza di due sottopopolazioni fenotipiche probabilmente distinte all'interno della stessa linea cellulare.

In letteratura, CD56 (anche noto come Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM) è un marcatore largamente studiato in contesti neurobiologici[138], ma è anche noto per la sua espressione eterogenea nei tumori mammari [139], dove può modulare interazioni cellulari e risposte immunitarie (ad esempio, sensibilità alle cellule Natural Killer); in studi di IHC (Immunohistochemistry/immunoistochimica) su tessuti di carcinoma mammario umano,

è stata osservata una significativa variabilità inter e intratumorale nell'espressione di CD56, con percentuali di cellule positive oscillanti tra il 30 % e il 70 % [140]. Analogamente, l'utilizzo di CD56 come biomarcatore ha permesso di predire la suscettibilità di alcune linee tumorali alla citotossicità esercitata dalle cellule NK (natural Killer), in funzione della sua presenza su cellule target [141].

Il risultato FACS ottenuto nella linea MDA-MB-468 (con due popolazioni visibili e suddivise in modo quasi simmetrico) rappresenta quindi una caratterizzazione biologicamente rilevante, in quanto evidenzia un'eterogeneità fenotipica intrinseca di questa linea. Questa particolare eterogeneità ha motivato la mia scelta di utilizzare la linea cellulare MDA-MB-468, come mio modello di studio principale per il prosieguo del progetto sulla plasticità fenotipica, offrendo un sistema ideale nel quale indagare dinamiche di transizione epitelio–mesenchimale (EMT) e stabilità/mobilità del fenotipo in esperimenti successivi.

In seguito, in parti dedicate, verranno riportate le effettive scoperte e capacità plastiche di questa linea cellulare, alla luce delle analisi comparative fra stimoli applicati e in particolare, dopo averne già evidenziato la capacità di spostarsi in seguito al trattamento con verteporfina, questa linea verrà analizzata con l'intento di studiarne più nel dettaglio la plasticità intrinseca e la dinamicità delle sue popolazioni cellulari.

3.4. Le sottopopolazioni delle MDA-MB-468 ritornano con il tempo a ristabilire un equilibrio fenotipico corrispondete a quello della popolazione parentale

Partendo dal presupposto che l'obiettivo generale del progetto fosse quello di indagare i meccanismi di plasticità fenotipica nelle cellule tumorali, fenomeno cruciale nell'eterogeneità tumorale, in cui sottopopolazioni cellulari apparentemente stabili possono, nel tempo, riconvertirsi e ristabilire equilibri caratteristici della linea parentale, lo studio delle dinamiche temporali nelle sottopopolazioni $CD56^+$ e $CD56^-$ della linea MDA-MB-468 si è configurato come un passaggio centrale. Questa linea cellulare è stata da me scelta, dopo la caratterizzazione della sua eterogeneità intrinseca e per la peculiare distribuzione del marcatore CD56 (NCAM), che la rendeva particolarmente adatta come modello di plasticità.

In letteratura è stata già dimostrata la capacità delle cellule tumorali di transitare tra stati distinti [142,143]. Alcune sottopopolazioni mostrano comportamenti più stabili, mentre altre tendono a ristabilire proporzioni fenotipiche originarie. Inoltre, fenomeni di transizioni e oscillazioni transitorie delle percentuali cellulari (overshoot), prima del ritorno a un equilibrio stabile, sono stati descritti come parte integrante delle dinamiche plastiche non genetiche [144,145]. Alla luce di queste evidenze, e di ciò che era già stato osservato nel modello delle SUM149, ovvero una capacità di transizione fenotipica con ritorno allo stato parentale, ho deciso di verificare se anche nelle MDA-MB-468 le due sottopopolazioni potessero modificare il proprio stato nel tempo, ristabilendo una condizione simile a quella della popolazione di origine.

Per questo motivo, la linea parentale è stata separata mediante citofluorimetria, ottenendo le due sottopopolazioni: $CD56^+$ e $CD56^-$ e al tempo 0 (immediatamente successivo alla separazione) poste in coltura come popolazioni distinte (**Figura 20 A-B**). Ogni giorno, per quattro giorni consecutivi, un campione è stato prelevato e analizzato al FACS per monitorare le variazioni percentuali. Questo primo time-course a breve termine ha mostrato che le cellule $CD56^-$ tendevano già dal giorno 1 a spostarsi verso lo stato opposto, raggiungendo valori molto simili a quelli della linea parentale entro il terzo giorno e presentando al quarto un transitorio sbilanciamento verso la frazione positiva (**Figura 20C**). Le cellule $CD56^+$, invece, mostravano anch'esse una riduzione progressiva della propria frazione già dal primo giorno,

ma con un andamento più instabile, caratterizzato da oscillazioni tra percentuali diverse nell'arco dei quattro giorni (**Figura 20D**).

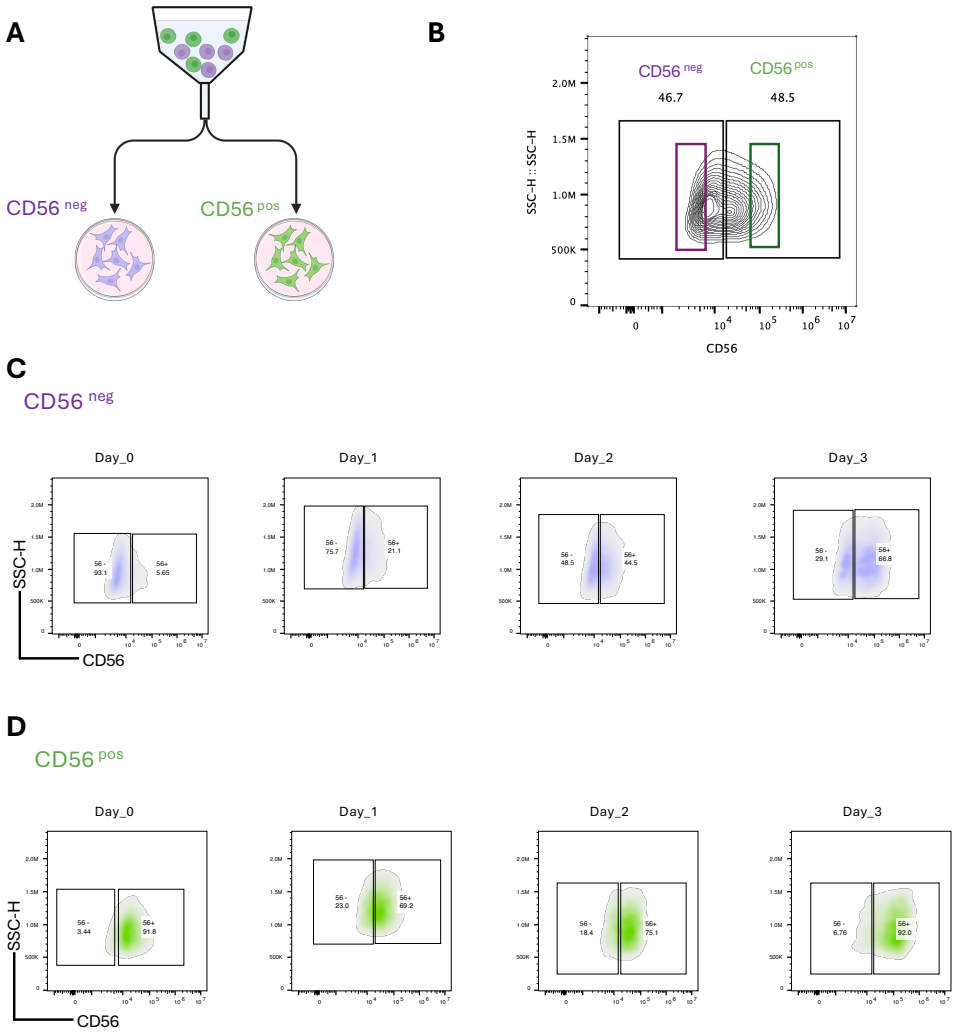


***Figura 20. A** Schema rappresentativo del sorting delle cellule in due sottopopolazioni distinte in base all'espressione di CD56 (CD56⁻ in viola e CD56⁺ in verde). **B** Schema grafico che rappresenta la strategia di raccolta delle popolazioni cellulari durante di sorting. **C-D** Monitoraggio giornaliero (giorni 0, 1, 2, 3) della percentuale di cellule CD56⁻ e CD56⁺ a partire dalle sottopopolazioni inizialmente isolate.*

Poiché questi risultati preliminari lasciavano intravedere un fenomeno di riconversione ma non consentivano di definirne appieno le dinamiche in maniera esaustiva, sono stati condotti due esperimenti prolungati della durata di 33 giorni. In questo caso, ad ogni split cellulare è stato prelevato un campione rappresentativo, fissato e analizzato al FACS in condizioni

uniformi, così da ridurre la variabilità legata alla colorazione mediante anticorpo (staining) e garantirne la comparabilità temporale.

L'analisi a lungo termine ha rivelato comportamenti differenti. La popolazione delle $CD56^{-}$, pur mostrando una parziale tendenza al ritorno verso lo stato parentale entro i primi cinque giorni, si sono mantenute in larga parte negative, con solo oscillazioni limitate e sporadiche transizioni verso la frazione positiva (più evidenti tra il ventisettesimo e il trentunesimo giorno, con valori di circa 70% negative e 30% positive). Successivamente, la popolazione è tornata prevalentemente negativa, suggerendo che, una volta isolate, queste cellule tendano a stabilizzarsi sul proprio fenotipo (**Figura 21 A-B**). È quindi possibile che siano necessari tempi ancora più lunghi per osservare una riconversione completa verso la condizione parentale.

Al contrario, la popolazione $CD56^{+}$ ha mostrato una spiccata capacità di ristabilire la condizione iniziale: già al terzo giorno era evidente un graduale spostamento verso la componente negativa, che si è mantenuto nel tempo con oscillazioni minime (ad esempio intorno al ventunesimo giorno), fino a riportare la popolazione a percentuali pressoché identiche a quelle della linea parentale e a conservarle fino al termine dei 33 giorni (**Figura 22 A-B**).

Queste dinamiche sono coerenti con quanto riportato in letteratura sulla plasticità non genetica e sull'equilibrio fenotipico nelle popolazioni tumorali. È stato dimostrato che sottopopolazioni isolate per uno specifico stato tendono, nel tempo, a ricreare proporzioni tipiche della linea d'origine, attraverso transizioni stocastiche e regolazioni epigenetiche[146] .

Inoltre, fenomeni di oscillazioni transitorie, in cui una frazione supera temporaneamente i valori di equilibrio prima di riallinearsi, sono già stati descritti in esperimenti simili [147]. Questi comportamenti confermano il concetto di eterogeneità funzionale della plasticità: alcune sottopopolazioni, come le $CD56^{-}$, mostrano una maggiore stabilità verso il proprio stato, mentre altre, come le $CD56^{+}$, risultano più dinamiche e propense a ristabilire l'equilibrio parentale [94,148].

In definitiva, i dati ottenuti evidenziano come le due sottopopolazioni $CD56^{+}$ e $CD56^{-}$ ottenute separando la linea parentale MDA-MB-468 si comportino in maniera qualitativamente distinta: le prime tendono a riequilibrare la distribuzione fenotipica tipica della linea parentale, mentre le seconde mostrano una maggiore propensione a mantenere lo stato negativo, pur con

oscillazioni episodiche. Queste osservazioni forniscono una base solida per ulteriori approfondimenti volti a identificare i meccanismi molecolari alla base di tali dinamiche e rafforzano il concetto di plasticità non genetica come tratto fondamentale dell'eterogeneità tumorale.

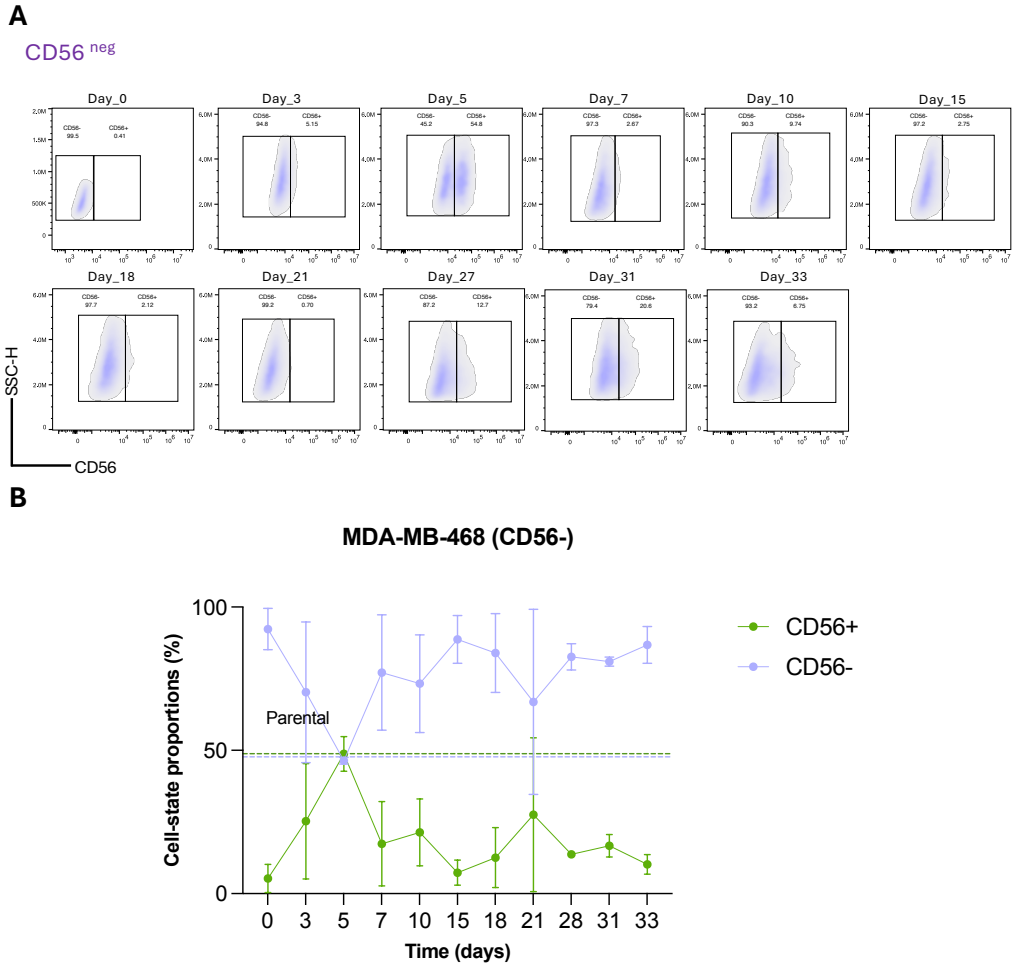


***Figura 21**. **A** Monitoraggio di cellule CD56⁻ separate tramite sorting dalla linea parentale per un tempo di 33 giorni analizzate tramite FACS, ogni punto è stato prelevato ad ogni passaggio cellulare e fissato. I grafici mostrano la dinamica della proporzione di cellule $CD56^{pos}$ e $CD56^{neg}$ nel tempo. **B** Grafico che mostra e proporzioni degli stati cellulari in percentuali nel tempo. Le linee tratteggiate rappresentano i livelli percentuali delle due popolazioni ($CD56^{+}$ e $CD56^{-}$) nella linea cellulare parentale non selezionata.*

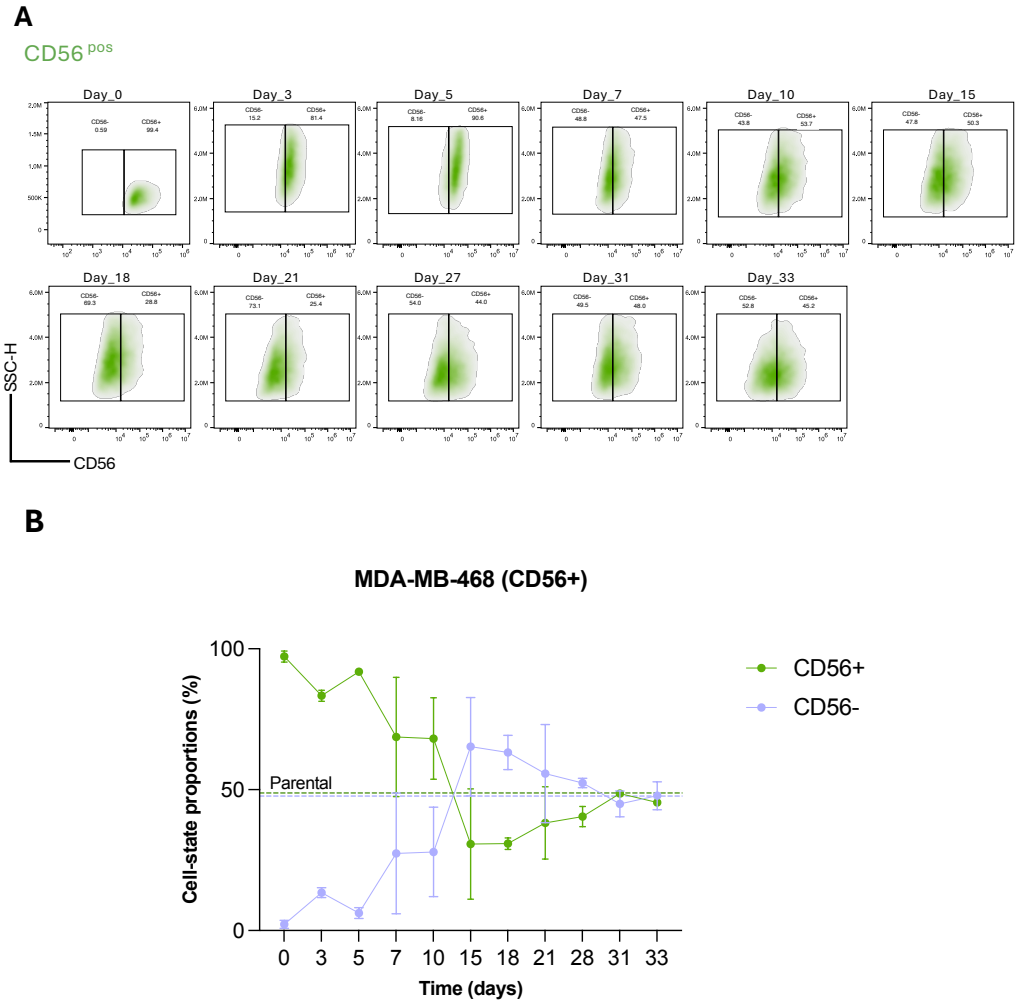


***Figura 22**. **A** Monitoraggio di cellule CD56⁺ separate tramite sorting dalla linea parentale per un tempo di 33 giorni analizzate tramite FACS, ogni punto è stato prelevato ad ogni passaggio cellulare e fissato. I grafici mostrano la dinamica della proporzione di cellule CD56⁺ e CD56⁻ nel tempo. **B** Grafico che mostra e proporzioni degli stati cellulari in percentuali nel tempo. Le linee tratteggiate rappresentano i livelli percentuali delle due popolazioni (CD56⁺ e CD56⁻) nella linea cellulare parentale non selezionata.*

3.4.1. Rilevazione tramite qPCR di differenze sostanziali nelle sottopopolazioni separate a partire della linea cellulare parentale MDA-MB-468

Per investigare in maniera più approfondita le caratteristiche trascrizionali delle due popolazioni cellulari identificate sulla base dell'espressione del marcatore CD56, una volta separate mediante sorting, da ciascuna delle due popolazioni è stato ottenuto un pellet cellulare (100.000 cellule per ognuna) da cui è stato estratto l'RNA totale per condurre un'analisi di espressione genica di una serie di marcatori associati a processi di plasticità cellulare e transizione epitelio-mesenchimale (EMT) a diversi intervalli temporali. I profili trascrizionali sono stati valutati sia al giorno 0, per caratterizzare l'espressione basale delle due popolazioni subito dopo la separazione, sia in corrispondenza di diversi timepoint (giorno 18, 21 e 40), al fine di monitorarne l'evoluzione dinamica nel tempo dei profili trascrizionali. Tutti i valori ottenuti sono stati comparati con quelli della linea parentale MDA-MB-468 non separata tramite sorting, ma mantenuta in coltura. (**Figura 23**).

I geni di interesse selezionati sui quali si è focalizzata l'attenzione sono cinque: il marker distintivo delle due sottopopolazioni CD56 (NCAM); i marcatori di superficie: vimentina (VIM) e Claudina (CLDN7), il primo considerato un marcatore canonico dello stato mesenchimale e frequentemente associato a cellule dotate di elevata motilità[149], la seconda proteina giunzionale rappresentativa dello stato epiteliale, la cui modulazione è stata più volte correlata a dinamiche di transizione e alla perdita di coesione cellulare[150], e infine i due fattori di trascrizione ZEB1 e TWIST, regolatori chiave nell'induzione dei programmi di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e notoriamente coinvolti nei processi di migrazione e invasione tumorale [151,152].

Come atteso, il marcatore di superficie CD56 mostra al giorno 0 un'espressione decisamente più elevata nella popolazione CD56+, confermando l'efficacia del sorting. Tuttavia, al giorno 18 si osserva una momentanea inversione, con livelli di espressione superiori nelle cellule CD56− e ridotti a meno della metà nella popolazione delle CD56+. Ai giorni 21 e 40, invece, il profilo trascrizionale torna a rispecchiare l'andamento iniziale, definendo una stabilizzazione dei livelli, con una distribuzione più simile a quella iniziale, in cui il marcatore di superficie CD56 risulta maggiormente espresso nelle cellule CD56+, pur mantenendo valori comparabili nella popolazione negativa. Questo andamento temporale suggerisce un progressivo avvicinamento delle due sottopopolazioni allo stato della popolazione parentale,

in accordo con la natura dinamica di questa linea cellulare; dunque, CD56 si conferma un marcatore distintivo per le MDA-MB-468, pur evidenziando transitori riequilibri durante il mantenimento in coltura (giorno 18,21 e 40) (**Figura 23C**).

Passando ai marcatori strutturali, partendo dalla vimentina, marcatore di identità mesenchimale, i livelli al giorno 0 risultavano leggermente più alti nelle cellule CD56+, con valori di espressione moderati anche nelle CD56−. Al giorno 18 emerge invece un incremento relativo nelle CD56−, con un'inversione di espressione di questo marcatore, in cui è possibile notare un'espressione circa doppia nella popolazione negativa rispetto alla controparte positiva, pur rimanendo su valori assoluti piuttosto bassi (intorno a 0.3 per le CD56− e 0.05 per le CD56+). Nei successivi timepoint, giorni 21 e 40, i livelli si stabilizzano e tornano a essere pressoché equivalenti tra le due frazioni: molto bassi al giorno 21 (~0.01) e leggermente più alti al giorno 40 (~0.03), ma sempre simili tra le due (**Figura 23A**).

Un comportamento più dinamico è stato invece riscontrato per la claudina7, marcatore epiteliale. In particolare, al giorno 0 la sua espressione risulta pressoché assente nelle cellule CD56+, mentre mostra livelli di espressione discreti (~0.3) nelle CD56−. Al giorno 18 si osserva un incremento nell' espressione di questo marcatore nella popolazione delle CD56+, raggiungendo valori prossimi a 18, a fronte di un'espressione di circa 4.8 nelle CD56−. Una simile distribuzione dell'espressione persiste al giorno 21, con valori elevate in entrambe le popolazioni (17 nelle CD56+ e 12 nelle CD56−), mentre al giorno 40 si assiste a una nuova inversione tra le popolazioni, con prevalenza nella frazione negativa (~15) rispetto a quella positiva (~10). Questo andamento suggerisce che la Claudina segue un pattern di espressione oscillante, con alternanza tra le due popolazioni in termini di predominanza espressiva (**Figura 23B**).

Considerando adesso i due fattori di trascrizione EMT, partiamo con il descrivere l'analisi di espressione di ZEB1, in cui si evidenziano livelli trascrizionali globalmente bassi, con un'espressione inizialmente maggiore nelle CD56− (~0.4) rispetto alle CD56+ (~0.03) al giorno 0, ma con una tendenza alla convergenza al giorno 18 nel quale i valori si aggirano attorno allo 0.02 e allo 0.01 rispettivamente. Al giorno 21 si osserva invece un decremento dei livelli di espressione, prossimi allo 0.001 nelle CD56+ e 0,0005 nelle CD56−, mentre al giorno 40 si rileva nuovamente un lieve incremento (~0.006 e ~0.004 rispettivamente). Da questi risultati si può dedurre che ZEB1 si mantiene sempre su valori molto ridotti, con variazioni quantitative minime tra le due frazioni (**Figura 23D**).

In ultimo, l'analisi dell'altro fattore trascrizionale TWIST, al contrario di quanto mostrato per ZEB1, mostra un andamento molto più marcato e dinamico. Al giorno 0 risulta significativamente più elevato nelle CD56− (~0.9) rispetto alle CD56+ (~0.003). Però già al giorno 18 entrambe le popolazioni mostrano un incremento deciso, con livelli di espressione nell'ordine di 100, valori simili si riscontrano anche al giorno 21, dove si delinea un'espressione in entrambe le frazioni che raggiunge valori prossimi a 1000. Nell'ultimo giorno di analisi (giorno 40) entrambi i sottogruppi conservano livelli elevati di espressione, con una leggera prevalenza espressiva nelle CD56− (tra 1000 e 10000) rispetto alle CD56+, che rimangono poco sopra 1000. In questo contesto, TWIST emerge come il gene con l'aumento di espressione più evidente e progressivo (**Figura 23E**).

Questi dati complessivamente descrivono l'andamento temporale dei principali marcatori analizzati, confermando che le due popolazioni separate tramite sorting presentano inizialmente differenze trascrizionali marcate che, con il progredire dei giorni, mantenendole in coltura, tendono a modulare e a ricondursi in maniera convergente allo stato della linea parentale.

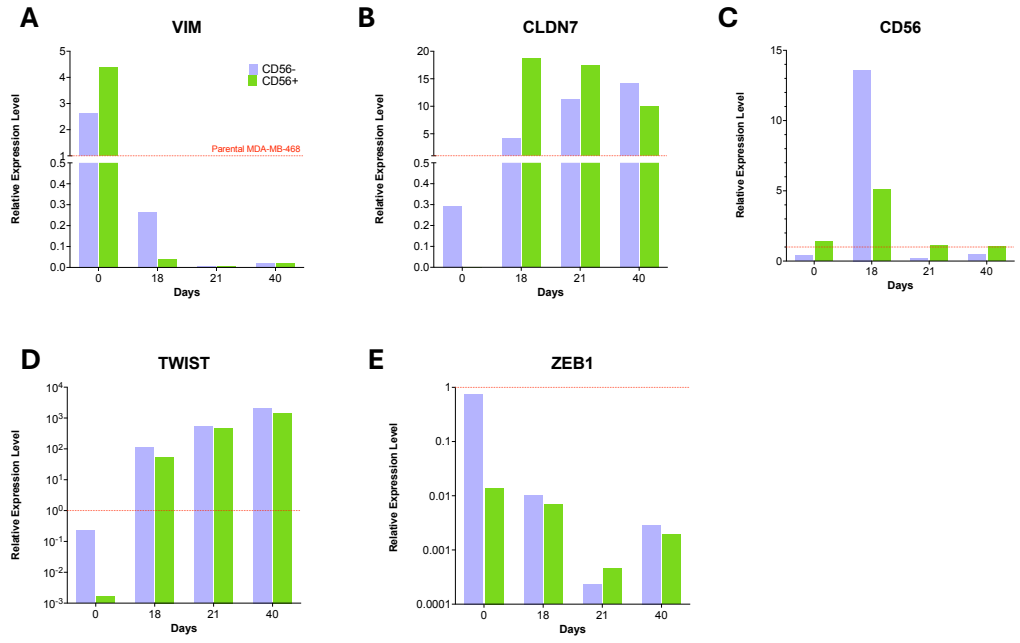


Figura 23. *Livelli di espressione genica (mRNA) delle due popolazioni cellulari CD56⁺ e CD56⁻ derivanti dal sorting della linea MDA-MB-468, analizzati ai giorni 0, 18, 21 e 40 di coltura. I pannelli mostrano l'andamento trascrizionale dei marcatori strutturali VIM* ***A*** *e CLDN7* ***B*** *del marcatore distintivo CD56/NCAM* ***C*** *e dei fattori di trascrizione TWIST* ***D*** *e*

ZEB1 ***E****. L'asse delle ordinate rappresenta i livelli relativi di mRNA, mentre quello delle ascisse i diversi time-point considerati, in termini di giorni. Le due colorazioni delle barre indicano l'espressione nelle popolazioni CD56⁺ (verde) e CD56⁻ (lilla). La linea rossa tratteggiata riporta il valore di riferimento della linea parentale non separata.*

3.4.2. Identificazione di una popolazione ibrida tramite analisi al microscopio confocale

Dopo aver definito le caratteristiche trascrizionali, come ultima analisi per definire le due popolazioni cellulari (CD56⁺ e CD56⁻), entrambe sono state sottoposte a colorazione per immunofluorescenza confocale. Dopo essere state fissate e preparate per l'IF, sono state marcate con DAPI per individuare il nucleo, e con due proteine per identificare le popolazioni di interesse: vimentina (marcatore mesenchimale) e claudina-7 (marcatore epiteliale). L'utilizzo di queste coniugazioni è ampiamente diffuso in microscopia a fluorescenza grazie alla loro alta foto-stabilità e agli spettri distinti che riducono la sovrapposizione di segnali[153,154].

La scelta di vimentina e claudina-7 per questa analisi è supportata dalla loro consolidata localizzazione a livello della membrana nelle linee tumorali mammarie: claudina-7, proteina transmembrana delle "tight junctions", il suo pattern è indicativo dello stato epiteliale o EMT associato[155,156]; per quanto riguarda la vimentina invece, seppur generalmente intracellulare, può risiedere anche in porzioni periferiche della cellula e talora sulla membrana, specialmente in cellule con potenziale metastatico aumentato [157,158].

Dal confronto diretto con i dati di qPCR, emergono alcune discrepanze interessanti: contrariamente a quanto osservato a livello trascrizionale, dove al giorno 0, la claudina-7 è espressa quasi esclusivamente nelle CD56⁻ e la vimentina risulta invece più alta nelle CD56⁺(**Figura 23B**), al confocale entrambe le proteine risultano visibili in entrambe le sottopopolazioni. In particolare, la claudina-7 (verde) appare espressa con intensità simile in entrambi i casi (CD56⁺ e CD56⁻) (**Figura 24**), suggerendo una possibile regolazione post-trascrizionale o differente localizzazione/turnover dell'mRNA e del proteoma. La vimentina (rosso), sebbene presente anch'essa in entrambe le popolazioni, mostra un'intensità maggiore nella popolazione CD56⁻ rispetto alle CD56⁺(**Figura 24**), risultato opposto rispetto alla qPCR, dove i livelli trascrizionali sono espressi in maniera maggioritaria nelle CD56⁺ (**Figura 23A**). Tali discordanze, sono piuttosto comuni in contesti tumorali, e possono essere attribuite a

fenomeni noti: come regolazione post-trascrizionale, differente stabilità o turnover tra mRNA e proteina, o ancora localizzazione subcellulare differente e dinamiche di instabilità delle proteine; fenomeni già ampiamente descritti in letteratura[158,159].

Infine, dalle immagini in figura, è evidente che in entrambi i casi, le proteine appaiono localizzate a livello della membrana o periferico-citoplasmatico nelle immagini, coerentemente con il loro ruolo funzionale nelle giunzioni intercellulari (claudina-7) o nella migrazione e adesione (vimentina).

La presenza di entrambi i marcatori cellulari sulla membrana suggerisce la loro potenziale funzionalità nella plasticità fenotipica e nell'integrazione dei segnali di adesione. In sintesi, la co-espressione proteica di marcatori tipicamente epiteliali (claudina-7) e mesenchimali (vimentina) in una stessa popolazione cellulare suggerisce la presenza di uno stato fenotipico ibrido, caratterizzato da elevata plasticità e possibili implicazioni funzionali nella progressione tumorale. Questo tipo di fenotipo ibrido, in cui vengono co-espressi simultaneamente marcatori tra loro antagonisti (epiteliali e mesenchimali), è ampiamente documentato in letteratura e associato a tratti aggressivi, come maggior plasticità, capacità di migrazione collettiva, tumorigenicità e prognosi negativa [160].

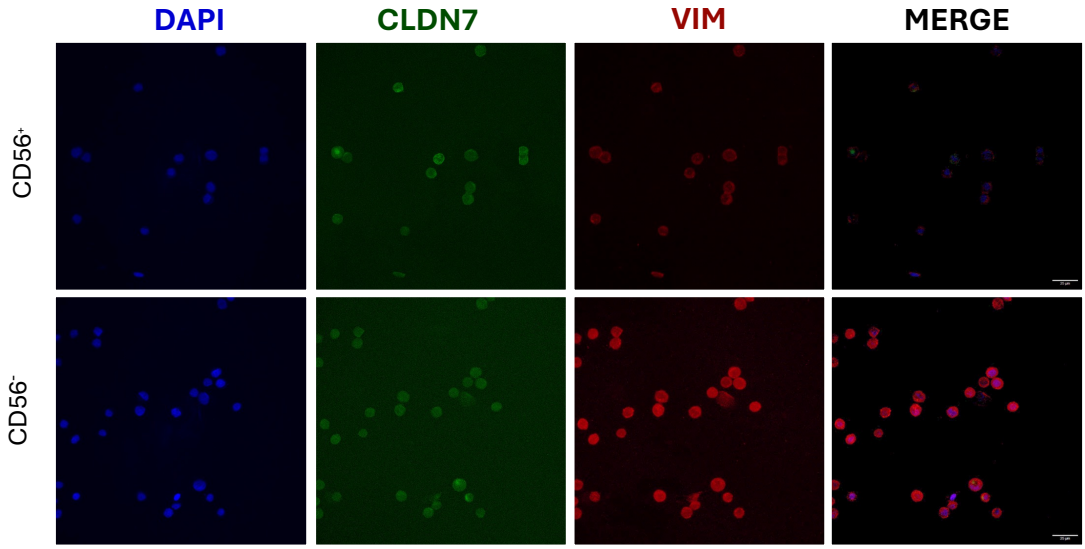


***Figura* 24**. *Analisi di immunofluorescenza confocale condotta sulle sottopopolazioni cellulari CD56⁺ (prima riga) e CD56⁻ (seconda riga). I nuclei sono marcati con DAPI (blu). La Claudina-7 è rappresentata nel canale del verde e la Vimentina nel rosso. Sono riportati i canali singoli e l'immagine dei due canali sovrapposti (merge). Scalebar: 25 µm.*

4. Discussione

Il tema della plasticità cellulare nel cancro e in questo caso specifico nel carcinoma mammario si colloca al centro di un dibattito scientifico sempre più rilevante. Negli ultimi anni, numerosi studi[161] hanno dimostrato che la progressione tumorale non può essere compresa pienamente adottando un modello statico di gerarchie cellulari (ovvero un modello di organizzazione tumorale in cui le CSC si collocano al vertice, capaci di auto-rinnovarsi e generare progenie, seguite da progenitori con potenziale proliferativo intermedio e, alla base, da cellule differenziate prive di capacità rigenerativa), ma richiede di riconoscere la capacità delle cellule tumorali di modulare il proprio fenotipo in risposta a stimoli interni ed esterni. A tal proposito, diversi fattori possono essere coinvolti tra cui le alterazioni trascrizionali, le interazioni con la matrice extracellulare, l'infiammazione cronica e in particolare la transizione epitelio-mesenchimale (EMT). Questa rappresenta un processo chiave, ma non sempre nella sua forma canonica (in cui la cellula perde tutte le sue caratteristiche epiteliali acquisendo totalmente fenotipi mesenchimali): l'emergere di stati ibridi epitelio-mesenchimali appare infatti come un elemento cruciale per spiegare metastasi e resistenza alle terapie[162].

Questa tesi sperimentale ha avuto come obiettivo proprio lo studio della plasticità cellulare e la EMT in modelli cellulari di carcinoma mammario, con particolare attenzione all'eterogeneità fenotipica e alla possibilità che coesistano stati cellulari ibridi. Attraverso approcci combinati di citometria a flusso, analisi trascrizionale e microscopia confocale, è stato possibile delineare un quadro articolato dei meccanismi che regolano la dinamica fenotipica delle cellule tumorali e le modalità con cui queste mantengono un equilibrio interno tra sottopopolazioni distinte.

I risultati ottenuti hanno confermato innanzitutto come la plasticità fenotipica sia una proprietà intrinseca di molte linee cellulari di carcinoma mammario. L'analisi iniziale condotta sulla linea triplo negativa SUM149 ha mostrato come le cellule siano costituite da sottopopolazioni basali, luminali e staminali che, dopo isolamento mediante sorting, tendono a riconvertirsi rapidamente alle proporzioni originarie. In particolare, la sottopopolazione basale, che rappresenta solo una frazione minoritaria (circa il 5 %) della popolazione parentale, si è dimostrata capace di generare in meno di un'ora cellule luminali e staminali, con una stabilizzazione progressiva delle proporzioni iniziali. Tale rapidità suggerisce che la plasticità non dipenda esclusivamente da segnali esogeni o da rumore trascrizionale, ma sia regolata

anche da programmi intrinseci di auto-mantenimento, probabilmente sostenuti da circuiti epigenetici bistabili o da geni "poised" pronti a essere rapidamente attivati.

Proprio per comprendere se e in che misura fattori estrinseci potessero modulare questa plasticità intrinseca, sono stati testati diversi stimoli esterni. Il trattamento con TGF-β e TNF-α, noti induttori di EMT in numerosi modelli [163] non ha provocato cambiamenti fenotipici significativi nelle SUM149 e neanche nelle MCF7 suggerendo che queste cellule siano parzialmente refrattarie a vie canoniche di induzione dell'EMT. Tale refrattarietà potrebbe dipendere da un'elevata espressione di fattori legati a EMT (come *ZEB1* o *SNAIL*)[164] o di geni che regolano la staminalità (come *SOX2* o *OCT4)*[165]. In alternativa potrebbe dipendere da uno stato epigenetico inibitorio preesistente[166] caratterizzato da ipermetilazione di promotori di geni differenziativi o arricchimento di segnali repressivi su loci pro-apoptotici che rendono la linea cellulare meno sensibile a tali stimoli. Al contrario, l'inibizione farmacologica del pathway YAP/TAZ con verteporfina ha indotto un marcato riassetto fenotipico (con netto spostamento delle cellule verso la popolazione mesenchimale), definendo una potenziale implicazione di questa via come regolatrice di stati ibridi e della plasticità tumorale.

Infine, la coltura in condizioni di ipossia ha generato modificazioni parziali (ovvero solo minime perturbazioni rispetto alle percentuali della condizione non trattata, quindi nel complesso non rilevanti) coerenti con l'evidenza che HIF1α e HIF2α possono promuovere stati cellulari più invasivi, senza però determinare una completa transizione[167]. In questo contesto, sarebbe importante valutare direttamente i livelli di espressione e l'attivazione funzionale di HIF1α e HIF2α analizzando la loro stabilizzazione, lo stato di fosforilazione e i principali regolatori a monte di questi pathways per chiarire il contributo specifico di ciascun fattore. Nel complesso, questi risultati indicano che le SUM149 e le MDA-MB-468 possiedono programmi intrinseci di plasticità indipendenti da stimoli esterni, ma che possono essere sensibilmente modulati da vie di segnale specifiche, come quella mediata da YAP/TAZ. Il pathway YAP/TAZ, effettori trascrizionali della via Hippo, è noto per il suo ruolo centrale nel controllo della proliferazione, della sopravvivenza e delle proprietà staminali delle cellule tumorali[168]. In condizioni di iperattivazione, YAP e TAZ si accumulano nel nucleo e interagiscono con fattori di trascrizione come TEAD, inducendo l'espressione di geni coinvolti in sopravvivenza, plasticità e progressione tumorale. Tra i target più noti vi sono CTGF e CYR61[169], che promuovono migrazione e rimodellamento della matrice extracellulare; AXL[170], associato a resistenza a inibitori di EGFR e MAPK[171]; geni anti-apoptotici come BIRC5 , che sostengono la sopravvivenza cellulare in risposta a chemio e

radioterapia; e fattori legati alla transizione epitelio-mesenchimale come SNAI2 (Slug) e CDH2 (N-cadherina)[172], che favoriscono il mantenimento di stati ibridi[173]. Inoltre, YAP/TAZ possono aumentare l'immuno-evasione tumorale tramite l'induzione di PD-L1[174]. Complessivamente, questi programmi trascrizionali contribuiscono a motilità cellulare, resistenza a diversi trattamenti (chemioterapia, inibitori di EGFR/MAPK, immunoterapia) e alla plasticità fenotipica tipica delle cellule tumorali aggressive[175]. Inoltre, YAP/TAZ integrano segnali meccano-sensibili derivati dal microambiente (rigidità della matrice extracellulare, interazioni con le integrine) con segnali oncogenici intracellulari (es. PI3K/AKT, WNT, TGF-β), posizionandosi come nodi chiave della rete di plasticità tumorale[176].

Nello specifico, l'inibizione farmacologica di YAP/TAZ tramite la verteporfina non solo interferisce con l'attivazione di programmi pro-invasivi e pro-staminali, ma determina anche un marcato riassetto fenotipico con predominanza dello stato mesenchimale, suggerendo che la dipendenza da questa via possa rappresentare una vulnerabilità terapeutica. Questi dati supportano l'ipotesi che YAP/TAZ agiscano come regolatori dinamici degli stati cellulari intermedi, modulando la transizione tra identità epiteliale, mesenchimale e ibrida.

Per estendere e validare le osservazioni sopra menzionate in un altro modello, abbiamo selezionato la linea triplo negativa MDA-MB-468. Contrariamente a quanto osservato nelle SUM149, in cui la plasticità si manifesta nell'arco di poche ore, nelle MDA-MB-468 i cambiamenti fenotipici richiedono diversi giorni, suggerendo una dinamica più lenta e, probabilmente, dipendente da: barriere epigenetiche pre-esistenti, segnali micro-ambientali aggiuntivi, attivazione di vie di segnale alternative, come EGFR/PI3K-AKT[177].

In questo contesto, per l'identificazione delle cellule plastiche è stato impiegato CD56 (NCAM), un marcatore classicamente associato a adesione cellulare e cellule neuroendocrine. Sebbene esso non sia comunemente utilizzato nello studio della plasticità tumorale in carcinoma mammario, la sua espressione nella linea cellulare triplo negativa MDA-MB-468 potrebbe ampliare il ventaglio di utilizzi di CD56 nello studio della plasticità anche in altri modelli di cancro.

La caratteristica più rilevante di questa linea è la presenza di due sottopopolazioni chiaramente distinte $CD56^+$ e $CD56^-$, la cui separazione netta ha consentito di analizzare in maniera diretta le dinamiche di riconversione. Le cellule $CD56^+$, coerentemente con quanto riportato in letteratura[178] sono state associate a uno stato più mesenchimale e basale, mentre le $CD56^-$

hanno mostrato un fenotipo più epiteliale e luminale. Dopo isolamento tramite sorting, entrambe le popolazioni hanno mostrato una tendenza a riavvicinarsi ai profili parentali, ma con tempistiche diverse: mentre la sottopopolazione $CD56^+$ ha mostrato un parziale recupero in pochi giorni, circa 5, la popolazione $CD56^-$ non è riuscita a ristabilire l'equilibrio originale, suggerendo che per questa transizione possano essere necessari tempi più lunghi o segnali non prodotti in condizioni di coltura isolata, ad esempio segnali paracrini e juxtacrini forniti da componenti stromali (es. TGF-β, IL-6, HGF)[179], della complessa composizione e rigidità della matrice extracellulare, di diversi gradienti di ossigeno/metaboliti o ancora di vescicole extracellulari; tutti elementi che *in vivo* favoriscono il rimodellamento fenotipico e che potrebbero essere necessari per completare la transizione osservata nell'altra popolazione cellulare (CD56+).

L'analisi trascrizionale mediante qPCR ha fornito ulteriori elementi di interesse. I marcatori epiteliali, come EPCAM e claudina-7, hanno mostrato livelli più elevati nelle sottopopolazioni $CD56^-$, mentre la vimentina è risultata più espressa nelle $CD56^+$, confermando la corrispondenza tra questi fenotipi e gli stati epiteliale/mesenchimale. Tuttavia, discrepanze tra livelli trascrizionali e proteici, in particolare per la vimentina, suggeriscono la presenza di meccanismi post-trascrizionali o differenze nella stabilità e turnover proteico. L'analisi congiunta di marcatori epiteliali (claudina-7), mesenchimali (vimentina) e fattori di trascrizione EMT (ZEB1 e TWIST) ha rafforzato questa interpretazione: se ZEB1 si mantiene su livelli marginali, TWIST mostra un incremento progressivo fino a raggiungere valori molto elevati, a indicare un ruolo centrale nell'attivazione di programmi di plasticità.

Questa osservazione è coerente con studi che hanno sottolineato come l'eterogeneità non si esprima solo a livello genico, ma anche tramite regolazioni post-traduzionali e di localizzazione subcellulare[180]. Futuri esperimenti di RNA-seq single-cell e di proteomica quantitativa potrebbero chiarire meglio queste discrepanze.

L'analisi al confocale ha ulteriormente corroborato la presenza di stati fenotipici ibridi. La co-espressione proteica di vimentina e claudina-7 nelle stesse cellule, osservata al confocale, fornisce un'ulteriore prova sperimentale di una condizione fenotipica ibrida. Entrambe le sottopopolazioni, infatti, hanno mostrato co-espressione di questi due marcatori di superficie, localizzati prevalentemente a livello della membrana plasmatica. Questa osservazione è particolarmente rilevante, poiché la vimentina è tipicamente considerata un marcatore citoplasmatico mesenchimale, mentre la sua localizzazione alla membrana suggerisce

possibili interazioni con complessi di adesione o rimodellamento del citoscheletro, già riportati in altri contesti tumorali [181]. La co-localizzazione di membrana della claudina-7 e della vimentina potrebbe quindi riflettere un'organizzazione spaziale funzionale degli stati ibridi, favorendo migrazione collettiva o cooperazione tra cellule. Futuri studi di immunoprecipitazione o imaging a super risoluzione potrebbero chiarire le interazioni molecolari alla base di questa co-espressione.

Nel complesso, i risultati ottenuti confermano come la plasticità cellulare non sia un fenomeno marginale, ma un tratto cardine del carcinoma mammario triplo negativo, capace di manifestarsi in tempi e modalità diversi a seconda del contesto cellulare. Se nelle SUM149 la plasticità appare rapida e intrinsecamente programmata, nelle MDA-MB-468 essa segue una dinamica più lenta e condizionata, ma in entrambi i casi il risultato finale è la tendenza al ristabilimento di un equilibrio eterogeneo. L'individuazione di stati ibridi, sostenuta da evidenze sia trascrizionali che proteiche, rafforza l'idea che tali stati non siano transitori, ma possano rappresentare configurazioni stabili con rilevanza funzionale nella progressione tumorale e nella resistenza ai trattamenti.

In sintesi, i risultati ottenuti forniscono nuove evidenze sulla reversibilità delle transizioni fenotipiche nel carcinoma mammario triplo negativo. La combinazione di analisi temporali, approcci di manipolazione genetica e studio di marcatori dinamici come EPCAM e CD56 ha permesso di delineare un quadro in cui la plasticità cellulare appare come un processo orchestrato da circuiti molecolari intrinseci, meccanismi cellulari e, probabilmente, epigenetici potenzialmente modulabile da stimoli esterni e fondamentale per comprendere sia l'eterogeneità del tumore sia i fenomeni di resistenza ai farmaci.

In conclusione, il lavoro presentato fornisce un contributo significativo alla comprensione della plasticità nel carcinoma mammario, proponendo la linea MDA-MB-468 come un modello particolarmente adatto per studiare le dinamiche di transizione tra stati cellulari. Più in generale, questi dati sottolineano come l'eterogeneità e gli stati ibridi non debbano essere considerati eccezioni, ma componenti fondamentali della biologia tumorale, con implicazioni dirette per la prognosi e per la definizione di strategie terapeutiche mirate.

Le prospettive future sono molteplici. Un primo passo sarà l'estensione delle analisi a dati clinici, come quelli presenti su dataset pubblicamente accessibili come The Cancer Genome Atlas (TCGA), per verificare se l'eterogeneità osservata *in vitro* corrisponda a differenze clinicamente rilevanti nei pazienti. In parallelo, esperimenti funzionali che valutino la risposta

delle sottopopolazioni $CD56^{+}$ e $CD56^{-}$ a trattamenti chemioterapici standard, ad esempio paclitaxel o 5-fluorouracile, potrebbero chiarire se l'eterogeneità fenotipica si traduce in vulnerabilità terapeutiche differenziali. Inoltre, lo sviluppo di modelli tridimensionali (sferoidi e organoidi) o *in vivo* potrebbe consentire di riprodurre più fedelmente il microambiente tumorale e testare la stabilità degli stati ibridi in condizioni fisiologicamente rilevanti.

5. Bibliografia

(1) Marusyk, A.; Polyak, K. Tumor Heterogeneity: Causes and Consequences. Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer **2010**, 1805 (1), 105–117. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.002.

(2) Cell Proliferation | Cell Biology Journal | Wiley Online Library. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cpr.13423 (accessed 2025-07-20).

(3) Marusyk, A.; Janiszewska, M.; Polyak, K. Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance. Cancer Cell **2020**, 37 (4), 471–484. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.007.

(4) Junttila, M. R.; de Sauvage, F. J. Influence of Tumour Micro-Environment Heterogeneity on Therapeutic Response. Nature **2013**, 501 (7467), 346–354. https://doi.org/10.1038/nature12626.

(5) Burrell, R. A.; Swanton, C. Tumour Heterogeneity and the Evolution of Polyclonal Drug Resistance. Mol. Oncol. **2014**, 8 (6), 1095–1111. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.06.005.

(6) Sfakianos, G. P.; Iversen, E. S.; Whitaker, R.; Akushevich, L.; Schildkraut, J. M.; Murphy, S. K.; Marks, J. R.; Berchuck, A. Validation of Ovarian Cancer Gene Expression Signatures for Survival and Subtype in Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissues. Gynecol. Oncol. **2013**, 129 (1), 159–164. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.12.030.

(7) The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution | Nature. https://www.nature.com/articles/nature12625 (accessed 2025-07-20).

(8) Molin, M. D.; Matthaei, H.; Wu, J.; Blackford, A.; Debeljak, M.; Rezaee, N.; Wolfgang, C. L.; Butturini, G.; Salvia, R.; Bassi, C.; Goggins, M. G.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Eshleman, J. R.; Hruban, R. H.; Maitra, A. Clinicopathological Correlates of Activating GNAS Mutations in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN) of the Pancreas. Ann. Surg. Oncol. **2013**, 20 (12), 10.1245/s10434-013-3096–1. https://doi.org/10.1245/s10434-013-3096-1.

(9) Alexandrov, L. B.; Kim, J.; Haradhvala, N. J.; Huang, M. N.; Tian Ng, A. W.; Wu, Y.; Boot, A.; Covington, K. R.; Gordenin, D. A.; Bergstrom, E. N.; Islam, S. M. A.; Lopez-Bigas, N.; Klimczak, L. J.; McPherson, J. R.; Morganella, S.; Sabarinathan, R.; Wheeler, D. A.; Mustonen, V.; Getz, G.; Rozen, S. G.; Stratton, M. R. The Repertoire of Mutational Signatures in Human Cancer. Nature **2020**, 578 (7793), 94–101. https://doi.org/10.1038/s41586-020-1943-3.

(10) Clonal evolution in cancer | Nature. https://www.nature.com/articles/nature10762 (accessed 2025-07-20).

(11) The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers | Nature. https://www.nature.com/articles/nature11219 (accessed 2025-07-20).

(12) Cancer genes and the pathways they control | Nature Medicine. https://www.nature.com/articles/nm1087 (accessed 2025-07-23).

(13) Genomic instability — an evolving hallmark of cancer | Nature Reviews Molecular Cell Biology. https://www.nature.com/articles/nrm2858 (accessed 2025-07-23).

(14) Crawford, J.; Chikina, M.; Greene, C. S. Optimizer's Dilemma: Optimization Strongly Influences Model Selection in Transcriptomic Prediction. Bioinforma. Adv. **2024**, 4 (1), vbae004. https://doi.org/10.1093/bioadv/vbae004.
(15) Brás, A.; Rodrigues, A. S.; Rueff, J. Copy Number Variations and Constitutional Chromothripsis (Review). Biomed. Rep. **2020**, 13 (3), 11. https://doi.org/10.3892/br.2020.1318.
(16) Lim, S. B.; Yeo, T.; Lee, W. D.; Bhagat, A. A. S.; Tan, S. J.; Tan, D. S. W.; Lim, W.-T.; Lim, C. T. Addressing Cellular Heterogeneity in Tumor and Circulation for Refined Prognostication. Proc. Natl. Acad. Sci. **2019**, 116 (36), 17957–17962. https://doi.org/10.1073/pnas.1907904116.
(17) Heitzer, E.; Haque, I. S.; Roberts, C. E. S.; Speicher, M. R. Current and Future Perspectives of Liquid Biopsies in Genomics-Driven Oncology. Nat. Rev. Genet. **2019**, 20 (2), 71–88. https://doi.org/10.1038/s41576-018-0071-5.
(18) Haven, B.; Heilig, E.; Donham, C.; Settles, M.; Vasilevsky, N.; Owen, K. Registered Report: A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. eLife 5, e09462. https://doi.org/10.7554/eLife.09462.
(19) Batlle, E.; Clevers, H. Cancer Stem Cells Revisited. Nat. Med. **2017**, 23 (10), 1124–1134. https://doi.org/10.1038/nm.4409.
(20) Publisher Correction: Lineage plasticity in cancer: a shared pathway of therapeutic resistance | Nature Reviews Clinical Oncology. https://www.nature.com/articles/s41571-020-0355-5 (accessed 2025-07-20).
(21) Transcriptional control of noise in gene expression | PNAS. https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0707904105?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed (accessed 2025-07-23).
(22) Saal, J. G.; Schneider, E. M.; Müller, C.; Waller, H. D. HTLV-I-Related Agent and Non-Hodgkin Lymphomas in Married Couple. Lancet Lond. Engl. **1987**, 1 (8534), 686–687. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)90448-x.
(23) Flavahan, W. A.; Drier, Y.; Liau, B. B.; Gillespie, S. M.; Venteicher, A. S.; Stemmer-Rachamimov, A. O.; Suvà, M. L.; Bernstein, B. E. Insulator Dysfunction and Oncogene Activation in IDH Mutant Gliomas. Nature **2016**, 529 (7584), 110–114. https://doi.org/10.1038/nature16490.
(24) Flavahan, W. A.; Gaskell, E.; Bernstein, B. E. Epigenetic Plasticity and the Hallmarks of Cancer. Science **2017**, 357 (6348), eaal2380. https://doi.org/10.1126/science.aal2380.
(25) Deininger, M.; Buchdunger, E.; Druker, B. J. The Development of Imatinib as a Therapeutic Agent for Chronic Myeloid Leukemia. Blood **2005**, 105 (7), 2640–2653. https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3097.
(26) Dannenberg, J.-H.; Berns, A. Drugging Drug Resistance. Cell **2010**, 141 (1), 18–20. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.020.
(27) KDM5 Histone Demethylase Activity Links Cellular Transcriptomic Heterogeneity to Therapeutic Resistance: Cancer Cell. https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(18)30480-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1535610818304 80X%3Fshowall%3Dtrue (accessed 2025-07-23).
(28) Dynamic Proteomics of Individual Cancer Cells in Response to a Drug | Science. https://www.science.org/doi/10.1126/science.1160165?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed (accessed 2025-07-23).
(29) Ebos, J. M. L.; Lee, C. R.; Cruz-Munoz, W.; Bjarnason, G. A.; Christensen, J. G.; Kerbel, R. S. Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor

of Tumor Angiogenesis. Cancer Cell **2009**, 15 (3), 232–239. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.021.
(30) Self-Organizing Properties of Mouse Pluripotent Cells Initiate Morphogenesis upon Implantation: Cell. https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(14)00075-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867414000750%3Fshowall%3Dtrue (accessed 2025-07-23).
(31) Torborg, S. R.; Li, Z.; Chan, J. E.; Tammela, T. Cellular and Molecular Mechanisms of Plasticity in Cancer. Trends Cancer **2022**, 8 (9), 735–746. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.04.007.
(32) Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell **2006**, 126 (4), 663–676. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024.
(33) Zhu, K.; Xie, V.; Huang, S. Epigenetic Regulation of Cancer Stem Cell and Tumorigenesis. Adv. Cancer Res. **2020**, 148, 1–26. https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.05.001.
(34) Tata, P. R.; Rajagopal, J. Plasticity in the Lung: Making and Breaking Cell Identity. Development **2017**, 144 (5), 755–766. https://doi.org/10.1242/dev.143784.
(35) Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration | Science. https://www.science.org/doi/10.1126/science.1242281?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed (accessed 2025-07-20).
(36) In vivo cellular plasticity and direct reprogramming. IGBMC. https://www.igbmc.fr/en/recherche/teams/in-vivo-cellular-plasticity-and-direct-reprogramming (accessed 2025-07-23).
(37) Flavahan, W. A. Epigenetic Plasticity, Selection, and Tumorigenesis. Biochem. Soc. Trans. **2020**, 48 (4), 1609–1621. https://doi.org/10.1042/BST20191215.
(38) Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration | Science. https://www.science.org/doi/10.1126/science.1242281?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed (accessed 2025-07-20).
(39) Chen, K.; Dorlhac de Borne, F.; Sierro, N.; Ivanov, N. V.; Alouia, M.; Koechler, S.; Otten, L. Organization of the TC and TE Cellular T-DNA Regions in Nicotiana Otophora and Functional Analysis of Three Diverged TE-6b Genes. Plant J. Cell Mol. Biol. **2018**, 94 (2), 274–287. https://doi.org/10.1111/tpj.13853.
(40) Spemann–Mangold Organizer. Wikipedia; 2025.
(41) Barker, N.; van Es, J. H.; Kuipers, J.; Kujala, P.; van den Born, M.; Cozijnsen, M.; Haegebarth, A.; Korving, J.; Begthel, H.; Peters, P. J.; Clevers, H. Identification of Stem Cells in Small Intestine and Colon by Marker Gene Lgr5. Nature **2007**, 449 (7165), 1003–1007. https://doi.org/10.1038/nature06196.
(42) Barker, N.; van Es, J. H.; Kuipers, J.; Kujala, P.; van den Born, M.; Cozijnsen, M.; Haegebarth, A.; Korving, J.; Begthel, H.; Peters, P. J.; Clevers, H. Identification of Stem Cells in Small Intestine and Colon by Marker Gene Lgr5. Nature **2007**, 449 (7165), 1003–1007. https://doi.org/10.1038/nature06196.
(43) Bodis-Wollner, I.; Von Gizycki, H.; Avitable, M.; Hussain, Z.; Javeid, A.; Habib, A.; Raza, A.; Sabet, M. Perisaccadic Occipital EEG Changes Quantified with Wavelet Analysis. Ann. N. Y. Acad. Sci. **2002**, 956, 464–467. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02856.x.
(44) Yu, C.; Wang, Y.; Xu, C.-C.; He, J.; Zhang, Q.-Y.; Yu, Z.-N. [Analyze and compare metabolic pathways of Bacillus cereus group]. Yi Chuan Hered. **2011**, 33 (10), 1057–1066. https://doi.org/10.3724/sp.j.1005.2011.01057.

(45) Ramírez-Trejo, M. del R.; Pérez-García, B.; Mendoza-Ruiz, A.; Valdez-Avila, R.; Espinosa-Matías, S. Observations of the Spore, Gametophyte and Young Sporophyte of Pteridium Caudatum (L.) Maxon Using Scanning Electron Microscopy. Micron Oxf. Engl. 1993 **2013**, 45, 37–44. https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.10.011.
(46) Marteau, P.; Laharie, D.; Colombel, J.-F.; Martin, L.; Coevoet, H.; Allez, M.; Cadiot, G.; Bourreille, A.; Carbonnel, F.; Bouhnik, Y.; Coffin, B.; Duclos, B.; Dupas, J. L.; Moreau, J.; Louis, E.; Mary, J.-Y.; GETAID. Interobserver Variation Study of the Rutgeerts Score to Assess Endoscopic Recurrence after Surgery for Crohn's Disease. J. Crohns Colitis **2016**, 10 (9), 1001–1005. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw082.
(47) Roy, S.; Silacci, P.; Stergiopulos, N. Biomechanical Properties of Decellularized Porcine Common Carotid Arteries. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **2005**, 289 (4), H1567-1576. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00564.2004.
(48) Smith, B. L.; Lanahan, C. R.; Specht, M. C.; Kelly, B. N.; Brown, C.; Strasfeld, D. B.; Ferrer, J. M.; Rai, U.; Tang, R.; Rice-Stitt, T.; Biernacka, A.; Brachtel, E. F.; Gadd, M. A. Correction to: Feasibility Study of a Novel Protease-Activated Fluorescent Imaging System for Real-Time, Intraoperative Detection of Residual Breast Cancer in Breast Conserving Surgery. Ann. Surg. Oncol. **2020**, 27 (Suppl 3), 967. https://doi.org/10.1245/s10434-020-08349-1.
(49) Liu, C.-H.; Zhang, J.-J.; Zhang, Q.-J.; Dong, Y.; Shi, Z.-D.; Hong, S.-H.; He, H.-G.; Wu, W.; Han, C.-H.; Hao, L. METTL3 Regulates the Proliferation, Metastasis and EMT Progression of Bladder Cancer through P3H4. Cell. Signal. **2024**, 113, 110971. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2023.110971.
(50) Sacco, J. L.; Gomez, E. W. Epithelial–Mesenchymal Plasticity and Epigenetic Heterogeneity in Cancer. Cancers **2024**, 16 (19), 3289. https://doi.org/10.3390/cancers16193289.
(51) Greenburg, G.; Hay, E. D. Epithelia Suspended in Collagen Gels Can Lose Polarity and Express Characteristics of Migrating Mesenchymal Cells. J. Cell Biol. **1982**, 95 (1), 333–339. https://doi.org/10.1083/jcb.95.1.333.
(52) Imodoye, S. O.; Adedokun, K. A.; Muhammed, A. O.; Bello, I. O.; Muhibi, M. A.; Oduola, T.; Oyenike, M. A. Understanding the Complex Milieu of Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Metastasis: New Insight Into the Roles of Transcription Factors. Front. Oncol. **2021**, 11. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.762817.
(53) Dequin, P.-F.; Meziani, F.; Quenot, J.-P.; Kamel, T.; Ricard, J.-D.; Badie, J.; Reignier, J.; Heming, N.; Plantefève, G.; Souweine, B.; Voiriot, G.; Colin, G.; Frat, J.-P.; Mira, J.-P.; Barbarot, N.; François, B.; Louis, G.; Gibot, S.; Guitton, C.; Giacardi, C.; Hraiech, S.; Vimeux, S.; L'Her, E.; Faure, H.; Herbrecht, J.-E.; Bouisse, C.; Joret, A.; Terzi, N.; Gacouin, A.; Quentin, C.; Jourdain, M.; Leclerc, M.; Coffre, C.; Bourgoin, H.; Lengellé, C.; Caille-Fénérol, C.; Giraudeau, B.; Le Gouge, A.; CRICS-TriGGERSep Network. Hydrocortisone in Severe Community-Acquired Pneumonia. N. Engl. J. Med. **2023**, 388 (21), 1931–1941. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2215145.
(54) Cell Press: Cell Press. https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(09)00666-4 (accessed 2025-07-23).
(55) Chen, Y.-B.; Cutler, C. S. Biomarkers for Acute GVHD: Can We Predict the Unpredictable? Bone Marrow Transplant. **2013**, 48 (6), 755–760. https://doi.org/10.1038/bmt.2012.143.
(56) Cosgrove, L.; Morrill, Z.; Yusif, M.; Vaswani, A.; Cathcart, S.; Troeger, R.; Karter, J. M. Drivers of and Solutions for the Overuse of Antidepressant Medication in Pediatric Populations. Front. Psychiatry **2020**, 11, 17. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2020.00017.
(57) Woo, L. N.; Guo, W. Y.; Wang, X.; Young, A.; Salehi, S.; Hin, A.; Zhang, Y.; Scott, J. A.; Chow, C. W. A 4-Week Model of House Dust Mite (HDM) Induced Allergic Airways

Inflammation with Airway Remodeling. Sci. Rep. **2018**, 8 (1), 6925. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24574-x.
(58) Arosio, F.; Branchini, C.; Barbieri, L.; Guasti, M. T. Failure to Produce Direct Object Clitic Pronouns as a Clinical Marker of SLI in School-Aged Italian Speaking Children. Clin. Linguist. Phon. **2014**, 28 (9), 639–663. https://doi.org/10.3109/02699206.2013.877081.
(59) AJH Visits. Am. J. Hypertens. **2011**, 24 (4), 371. https://doi.org/10.1038/ajh.2011.44.
(60) VanderVorst, K.; Dreyer, C. A.; Konopelski, S. E.; Lee, H.; Ho, H.-Y. H.; Carraway, K. L. Wnt/PCP Signaling Contribution to Carcinoma Collective Cell Migration and Metastasis. Cancer Res. **2019**, 79 (8), 1719–1729. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2757.
(61) Palmiter, R. D. New Game for Hunger Neurons. Nat. Neurosci. **2012**, 15 (8), 1060–1061. https://doi.org/10.1038/nn.3167.
(62) Nagore, E.; Heidenreich, B.; Rachakonda, S.; Garcia-Casado, Z.; Requena, C.; Soriano, V.; Frank, C.; Traves, V.; Quecedo, E.; Sanjuan-Gimenez, J.; Hemminki, K.; Landi, M. T.; Kumar, R. TERT Promoter Mutations in Melanoma Survival. Int. J. Cancer **2016**, 139 (1), 75–84. https://doi.org/10.1002/ijc.30042.
(63) Jorgenson, E.; Matharu, N.; Palmer, M. R.; Yin, J.; Shan, J.; Hoffmann, T. J.; Thai, K. K.; Zhou, X.; Hotaling, J. M.; Jarvik, G. P.; Ahituv, N.; Wessells, H.; Van Den Eeden, S. K. Reply to Liu et al.: Tissue Specificity of SIM1 Gene Expression and Erectile Dysfunction. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **2019**, 116 (9), 3349–3350. https://doi.org/10.1073/pnas.1900162116.
(64) Liau, B. B.; Sievers, C.; Donohue, L. K.; Gillespie, S. M.; Flavahan, W. A.; Miller, T. E.; Venteicher, A. S.; Hebert, C. H.; Carey, C. D.; Rodig, S. J.; Shareef, S. J.; Najm, F. J.; van Galen, P.; Wakimoto, H.; Cahill, D. P.; Rich, J. N.; Aster, J. C.; Suvà, M. L.; Patel, A. P.; Bernstein, B. E. Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance. Cell Stem Cell **2017**, 20 (2), 233-246.e7. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.003.
(65) Tam, W. L.; Weinberg, R. A. The Epigenetics of Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer. Nat. Med. **2013**, 19 (11), 1438–1449. https://doi.org/10.1038/nm.3336.
(66) Haven, B.; Heilig, E.; Donham, C.; Settles, M.; Vasilevsky, N.; Owen, K.; Reproducibility Project: Cancer Biology; Reproducibility Project Cancer Biology. Registered Report: A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. eLife **2016**, 5, e09462. https://doi.org/10.7554/eLife.09462.
(67) Wainwright, E. N.; Scaffidi, P. Epigenetics and Cancer Stem Cells: Unleashing, Hijacking, and Restricting Cellular Plasticity. Trends Cancer **2017**, 3 (5), 372–386. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.004.
(68) Davies, A.; Zoubeidi, A.; Beltran, H.; Selth, L. A. The Transcriptional and Epigenetic Landscape of Cancer Cell Lineage Plasticity. Cancer Discov. **2023**, 13 (8), 1771–1788. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-0225.
(69) Easwaran, H.; Tsai, H.-C.; Baylin, S. B. Cancer Epigenetics: Tumor Heterogeneity, Plasticity of Stem-like States, and Drug Resistance. Mol. Cell **2014**, 54 (5), 716–727. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.015.
(70) Marusyk, A.; Almendro, V.; Polyak, K. Intra-Tumour Heterogeneity: A Looking Glass for Cancer? Nat. Rev. Cancer **2012**, 12 (5), 323–334. https://doi.org/10.1038/nrc3261.
(71) Thudi, N. K.; Shu, S. T.; Martin, C. K.; Lanigan, L. G.; Nadella, M. V. P.; Van Bokhoven, A.; Werbeck, J. L.; Simmons, J. K.; Murahari, S.; Kisseberth, W. C.; Breen, M.; Williams, C.; Chen, C.-S.; McCauley, L. K.; Keller, E. T.; Rosol, T. J. Development of a Brain Metastatic Canine Prostate Cancer Cell Line. The Prostate **2011**, 71 (12), 1251–1263. https://doi.org/10.1002/pros.21341.

(72) Perri, F.; Ionna, F.; Muto, P.; Marzo, M. D.; Caponigro, F.; Longo, F.; Vittoria Scarpati, G. D.; Lorenzo, G. D.; Giuliano, M.; Solla, R. Genetics and Management of Locally Advanced Carcinomas of the Head and Neck: Role of Altered Fractionation Radiotherapy. Future Sci. OA **2019**, 5 (1), FSO347. https://doi.org/10.4155/fsoa-2018-0058.
(73) Qiu, W.; Hu, M.; Sridhar, A.; Opeskin, K.; Fox, S.; Shipitsin, M.; Trivett, M.; Thompson, E. R.; Ramakrishna, M.; Gorringe, K. L.; Polyak, K.; Haviv, I.; Campbell, I. G. No Evidence of Clonal Somatic Genetic Alterations in Cancer-Associated Fibroblasts from Human Breast and Ovarian Carcinomas. Nat. Genet. **2008**, 40 (5), 650–655. https://doi.org/10.1038/ng.117.
(74) Voutsadakis, I. A. EMT Features in Claudin-Low versus Claudin-Non-Suppressed Breast Cancers and the Role of Epigenetic Modifications. Curr. Issues Mol. Biol. **2023**, 45 (7), 6040–6054. https://doi.org/10.3390/cimb45070381.
(75) Prat, A.; Perou, C. M. Deconstructing the Molecular Portraits of Breast Cancer. Mol. Oncol. **2011**, 5 (1), 5–23. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003.
(76) Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumors. Nature **2012**, 490 (7418), 61–70. https://doi.org/10.1038/nature11412.
(77) Prat, A.; Parker, J. S.; Karginova, O.; Fan, C.; Livasy, C.; Herschkowitz, J. I.; He, X.; Perou, C. M. Phenotypic and Molecular Characterization of the Claudin-Low Intrinsic Subtype of Breast Cancer. Breast Cancer Res. BCR **2010**, 12 (5), R68. https://doi.org/10.1186/bcr2635.
(78) Dawood, S.; Hu, R.; Homes, M. D.; Collins, L. C.; Schnitt, S. J.; Connolly, J.; Colditz, G. A.; Tamimi, R. M. Defining Breast Cancer Prognosis Based on Molecular Phenotypes: Results from a Large Cohort Study. Breast Cancer Res. Treat. **2011**, 126 (1), 185–192. https://doi.org/10.1007/s10549-010-1113-7.
(79) Parker, J. S.; Mullins, M.; Cheang, M. C. U.; Leung, S.; Voduc, D.; Vickery, T.; Davies, S.; Fauron, C.; He, X.; Hu, Z.; Quackenbush, J. F.; Stijleman, I. J.; Palazzo, J.; Marron, J. S.; Nobel, A. B.; Mardis, E.; Nielsen, T. O.; Ellis, M. J.; Perou, C. M.; Bernard, P. S. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. **2009**, 27 (8), 1160–1167. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.1370.
(80) Kennecke, H.; Yerushalmi, R.; Woods, R.; Cheang, M. C. U.; Voduc, D.; Speers, C. H.; Nielsen, T. O.; Gelmon, K. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. **2010**, 28 (20), 3271–3277. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.9820.
(81) Gupta, P. B.; Fillmore, C. M.; Jiang, G.; Shapira, S. D.; Tao, K.; Kuperwasser, C.; Lander, E. S. Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. Cell **2011**, 146 (4), 633–644. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.026.
(82) Vegliante, R.; Pastushenko, I.; Blanpain, C. Deciphering Functional Tumor States at Single-cell Resolution. EMBO J. **2022**, 41 (2), e109221. https://doi.org/10.15252/embj.2021109221.
(83) Zhou, J. X.; Pisco, A. O.; Qian, H.; Huang, S. Nonequilibrium Population Dynamics of Phenotype Conversion of Cancer Cells. PLoS ONE **2014**, 9 (12), e110714. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110714.
(84) Vegliante, R.; Pastushenko, I.; Blanpain, C. Deciphering Functional Tumor States at Single-cell Resolution. EMBO J. **2022**, 41 (2), e109221. https://doi.org/10.15252/embj.2021109221.
(85) An in vitro model of tumor heterogeneity resolves genetic, epigenetic, and stochastic sources of cell state variability | PLOS Biology.

https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371%2Fjournal.pbio.3000797&utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-07-25).
(86) Smith, S. E.; Mellor, P.; Ward, A. K.; Kendall, S.; McDonald, M.; Vizeacoumar, F. S.; Vizeacoumar, F. J.; Napper, S.; Anderson, D. H. Molecular Characterization of Breast Cancer Cell Lines through Multiple Omic Approaches. Breast Cancer Res. **2017**, 19 (1), 65. https://doi.org/10.1186/s13058-017-0855-0.
(87) Dai, X.; Cheng, H.; Bai, Z.; Li, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. J. Cancer **2017**, 8 (16), 3131–3141. https://doi.org/10.7150/jca.18457.
(88) Shibata, H.; Miuma, S.; Saldivar, J. C.; Huebner, K. Response of Subtype Specific Human Breast Cancer-Derived Cells to PARP and Chk1 Inhibition. Cancer Sci. **2011**, 102 (10), 1882–1888. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02016.x.
(89) Gattenlöhner, S.; Stühmer, T.; Leich, E.; Reinhard, M.; Etschmann, B.; Völker, H.-U.; Rosenwald, A.; Serfling, E.; Bargou, R. C.; Ertl, G.; Einsele, H.; Müller-Hermelink, H.-K. Specific Detection of CD56 (NCAM) Isoforms for the Identification of Aggressive Malignant Neoplasms with Progressive Development. Am. J. Pathol. **2009**, 174 (4), 1160–1171. https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080647.
(90) Wang, Y.; Waters, J.; Leung, M. L.; Unruh, A.; Roh, W.; Shi, X.; Chen, K.; Scheet, P.; Vattathil, S.; Liang, H.; Multani, A.; Zhang, H.; Zhao, R.; Michor, F.; Meric-Bernstam, F.; Navin, N. E. Clonal Evolution in Breast Cancer Revealed by Single Nucleus Genome Sequencing. Nature **2014**, 512 (7513), 155–160. https://doi.org/10.1038/nature13600.
(91) Kim, C.; Gao, R.; Sei, E.; Brandt, R.; Hartman, J.; Hatschek, T.; Crosetto, N.; Foukakis, T.; Navin, N. E. Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. Cell **2018**, 173 (4), 879-893.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.041.
(92) Patel, A. P.; Tirosh, I.; Trombetta, J. J.; Shalek, A. K.; Gillespie, S. M.; Wakimoto, H.; Cahill, D. P.; Nahed, B. V.; Curry, W. T.; Martuza, R. L.; Louis, D. N.; Rozenblatt-Rosen, O.; Suvà, M. L.; Regev, A.; Bernstein, B. E. Single-Cell RNA-Seq Highlights Intratumoral Heterogeneity in Primary Glioblastoma. Science **2014**, 344 (6190), 1396–1401. https://doi.org/10.1126/science.1254257.
(93) Kawasaki, Y.; Sakimura, A.; Park, C. M.; Tomaru, R.; Tanaka, T.; Ozawa, T.; Zhou, Y.; Narita, K.; Kishi, H.; Muraguchi, A.; Sakurai, H. Feedback Control of ErbB2 via ERK-Mediated Phosphorylation of a Conserved Threonine in the Juxtamembrane Domain. Sci. Rep. **2016**, 6, 31502. https://doi.org/10.1038/srep31502.
(94) Jiang, D.-Q.; Wang, Y.; Zhou, D. Phenotypic Equilibrium as Probabilistic Convergence in Multi-Phenotype Cell Population Dynamics. PLoS ONE **2017**, 12 (2), e0170916. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170916.
(95) Kristiansen, G.; Sammar, M.; Altevogt, P. Tumour Biological Aspects of CD24, a Mucin-like Adhesion Molecule. J. Mol. Histol. **2004**, 35 (3), 255–262. https://doi.org/10.1023/b:hijo.0000032357.16261.c5.
(96) Wang, Z.; Wang, Q.; Wang, Q.; Wang, Y.; Chen, J. Prognostic Significance of CD24 and CD44 in Breast Cancer: A Meta-Analysis. Int. J. Biol. Markers **2017**, 32 (1), e75–e82. https://doi.org/10.5301/jbm.5000224.
(97) Liao, S.-J.; Luo, J.; Li, D.; Zhou, Y.-H.; Yan, B.; Wei, J.-J.; Tu, J.-C.; Li, Y.-R.; Zhang, G.-M.; Feng, Z.-H. TGF-B1 and TNF-α Synergistically Induce Epithelial to Mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells by Enhancing TAK1 Activation. J. Cell Commun. Signal. **2019**, 13 (3), 369–380. https://doi.org/10.1007/s12079-019-00508-8.
(98) He, Q.; Gong, Y.; Gower, L.; Yang, X.; Friesel, R. E. Sef Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. J. Cell. Biochem. **2016**, 117 (10), 2346–2356. https://doi.org/10.1002/jcb.25532.

(99) Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2014**, 15 (3), 178–196. https://doi.org/10.1038/nrm3758.
(100) Shang, Y.; Liang, Y.; Zhang, B.; Wu, W.; Peng, Y.; Wang, J.; Zhang, M.; Niu, C. Periostin-Mediated Activation of NF-κB Signaling Promotes Tumor Progression and Chemoresistance in Glioblastoma. Sci. Rep. **2025**, 15 (1), 13955. https://doi.org/10.1038/s41598-025-92969-8.
(101) Yu, L.; Mu, Y.; Sa, N.; Wang, H.; Xu, W. Tumor Necrosis Factor α Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Promotes Metastasis via NF-κB Signaling Pathway-Mediated TWIST Expression in Hypopharyngeal Cancer. Oncol. Rep. **2014**, 31 (1), 321–327. https://doi.org/10.3892/or.2013.2841.
(102) Li, C.-W.; Xia, W.; Huo, L.; Lim, S.-O.; Wu, Y.; Hsu, J. L.; Chao, C.-H.; Yamaguchi, H.; Yang, N.-K.; Ding, Q.; Wang, Y.; Lai, Y.-J.; LaBaff, A. M.; Wu, T.-J.; Lin, B.-R.; Yang, M.-H.; Hortobagyi, G. N.; Hung, M.-C. Epithelial-Mesenchyme Transition Induced by TNF-α Requires NF-κB-Mediated Transcriptional Upregulation of Twist1. Cancer Res. **2012**, 72 (5), 1290–1300. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3123.
(103) Liao, S.-J.; Luo, J.; Li, D.; Zhou, Y.-H.; Yan, B.; Wei, J.-J.; Tu, J.-C.; Li, Y.-R.; Zhang, G.-M.; Feng, Z.-H. TGF-B1 and TNF-α Synergistically Induce Epithelial to Mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells by Enhancing TAK1 Activation. J. Cell Commun. Signal. **2019**, 13 (3), 369–380. https://doi.org/10.1007/s12079-019-00508-8.
(104) Mercogliano, M. F.; Bruni, S.; Elizalde, P. V.; Schillaci, R. Tumor Necrosis Factor α Blockade: An Opportunity to Tackle Breast Cancer. Front. Oncol. **2020**, 10, 584. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00584.
(105) Jordan, N. V.; Prat, A.; Abell, A. N.; Zawistowski, J. S.; Sciaky, N.; Karginova, O. A.; Zhou, B.; Golitz, B. T.; Perou, C. M.; Johnson, G. L. SWI/SNF Chromatin-Remodeling Factor Smarcd3/Baf60c Controls Epithelial-Mesenchymal Transition by Inducing Wnt5a Signaling. Mol. Cell. Biol. **2013**, 33 (15), 3011–3025. https://doi.org/10.1128/MCB.01443-12.
(106) Brown, T. C.; Sankpal, N. V.; Gillanders, W. E. Functional Implications of the Dynamic Regulation of EpCAM during Epithelial-to-Mesenchymal Transition. Biomolecules **2021**, 11 (7), 956. https://doi.org/10.3390/biom11070956.
(107) Long, X.; Yu, B.; Chen, M.; Zhang, Q.; Wang, Y.; Huang, Y.; Wu, J.; Cen, P.; Lan, H.; Long, J.; Zhang, Z.; Zhong, J.; Duan, X.; Yu, Q.; Gu, D. TGF-B1 Mediates Epithelial-Mesenchymal Transition in Interstitial Cystitis through the Regulation of ROCK. Eur. J. Pharmacol. **2025**, 1006, 178184. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2025.178184.
(108) Kim, E.-Y.; Kim, J.-E.; Choi, B.; Kweon, J.; Park, S.-O.; Lee, H.-S.; Lee, E.-J.; Oh, S.; Shin, H. R.; Choi, H.; Kim, Y.; Chang, E.-J. AWP1 Restrains the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells Induced by TNF-α. Front. Oncol. **2021**, 11, 631469. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.631469.
(109) TGF-β Stimulation of EMT Programs Elicits Non-genomic ER-α Activity and Anti-estrogen Resistance in Breast Cancer Cells - PMC. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5612668/?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-09-22).
(110) Gulhati, P.; Bowen, K. A.; Liu, J.; Stevens, P. D.; Rychahou, P. G.; Chen, M.; Lee, E. Y.; Weiss, H. L.; O'Connor, K. L.; Gao, T.; Evers, B. M. mTORC1 and mTORC2 Regulate EMT, Motility, and Metastasis of Colorectal Cancer via RhoA and Rac1 Signaling Pathways. Cancer Res. **2011**, 71 (9), 3246–3256. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4058.
(111) The role of the mTOR pathway in breast cancer stem cells (BCSCs): mechanisms and therapeutic potentials | Stem Cell Research & Therapy | Full Text.

https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-025-04218-4?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-09-22).
(112) Del Bufalo, D.; Ciuffreda, L.; Trisciuoglio, D.; Desideri, M.; Cognetti, F.; Zupi, G.; Milella, M. Antiangiogenic Potential of the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Temsirolimus. Cancer Res. **2006**, 66 (11), 5549–5554. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2825.
(113) Williams, K. P.; Allensworth, J. L.; Ingram, S. M.; Smith, G. R.; Aldrich, A. J.; Sexton, J. Z.; Devi, G. R. Quantitative High-Throughput Efficacy Profiling of Approved Oncology Drugs in Inflammatory Breast Cancer Models of Acquired Drug Resistance and Re-Sensitization. Cancer Lett. **2013**, 337 (1), 77–89. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.017.
(114) Noguchi, S.; Saito, A.; Nagase, T. YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer. Int. J. Mol. Sci. **2018**, 19 (11), 3674. https://doi.org/10.3390/ijms19113674.
(115) Zanconato, F.; Cordenonsi, M.; Piccolo, S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. Cancer Cell **2016**, 29 (6), 783–803. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.005.
(116) YAP/TAZ: Drivers of Tumor Growth, Metastasis, and Resistance to Therapy - Thompson - 2020 - BioEssays - Wiley Online Library. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.201900162?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-08-20).
(117) Noguchi, S.; Saito, A.; Nagase, T. YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer. Int. J. Mol. Sci. **2018**, 19 (11), 3674. https://doi.org/10.3390/ijms19113674.
(118) Chen, H.; Zhang, L.-F.; Miao, Y.; Xi, Y.; Li, X.; Liu, M.-F.; Zhang, M.; Li, B. Verteporfin Suppresses YAP-Induced Glycolysis in Breast Cancer Cells. J. Invest. Surg. **2023**, 36 (1), 2266732. https://doi.org/10.1080/08941939.2023.2266732.
(119) Chaturvedi, P.; Gilkes, D. M.; Wong, C. C. L.; Kshitiz; Luo, W.; Zhang, H.; Wei, H.; Takano, N.; Schito, L.; Levchenko, A.; Semenza, G. L. Hypoxia-Inducible Factor–Dependent Breast Cancer–Mesenchymal Stem Cell Bidirectional Signaling Promotes Metastasis. J. Clin. Invest. **2013**, 123 (1), 189–205. https://doi.org/10.1172/JCI64993.
(120) Rankin, E. B.; Giaccia, A. J. Hypoxic Control of Metastasis. Science **2016**, 352 (6282), 175–180. https://doi.org/10.1126/science.aaf4405.
(121) Chen, J.; Imanaka, N.; Chen, J.; Griffin, J. D. Hypoxia Potentiates Notch Signaling in Breast Cancer Leading to Decreased E-Cadherin Expression and Increased Cell Migration and Invasion. Br. J. Cancer **2010**, 102 (2), 351–360. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605486.
(122) Liu, X.; Xie, P.; Hao, N.; Zhang, M.; Liu, Y.; Liu, P.; Semenza, G. L.; He, J.; Zhang, H. HIF-1-Regulated Expression of Calreticulin Promotes Breast Tumorigenesis and Progression through Wnt/β-Catenin Pathway Activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **2021**, 118 (44), e2109144118. https://doi.org/10.1073/pnas.2109144118.
(123) Obeagu, E. I. Oxygen Gradients in Tumor Tissues Implications for Breast Cancer Metastasis - a Narrative Review. Ann. Med. Surg. 2012 **2025**, 87 (6), 3372–3380. https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000003121.
(124) Hiraga, T.; Kizaka-Kondoh, S.; Hirota, K.; Hiraoka, M.; Yoneda, T. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 Expression Enhance Osteolytic Bone Metastases of Breast Cancer. Cancer Res. **2007**, 67 (9), 4157–4163. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2355.
(125) Gupta, P. B.; Fillmore, C. M.; Jiang, G.; Shapira, S. D.; Tao, K.; Kuperwasser, C.; Lander, E. S. Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in

Populations of Cancer Cells. Cell **2011**, 146 (4), 633–644. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.026.
(126) Nieto, M. A.; Huang, R. Y.-J.; Jackson, R. A.; Thiery, J. P. EMT: 2016. Cell **2016**, 166 (1), 21–45. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028.
(127) Dongre, A.; Weinberg, R. A. New Insights into the Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition and Implications for Cancer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2019**, 20 (2), 69–84. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4.
(128) Prat, A.; Adamo, B.; Cheang, M. C. U.; Anders, C. K.; Carey, L. A.; Perou, C. M. Molecular Characterization of Basal-like and Non-Basal-like Triple-Negative Breast Cancer. The Oncologist **2013**, 18 (2), 123–133. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0397.
(129) Neve, R. M.; Chin, K.; Fridlyand, J.; Yeh, J.; Baehner, F. L.; Fevr, T.; Clark, L.; Bayani, N.; Coppe, J.-P.; Tong, F.; Speed, T.; Spellman, P. T.; DeVries, S.; Lapuk, A.; Wang, N. J.; Kuo, W.-L.; Stilwell, J. L.; Pinkel, D.; Albertson, D. G.; Waldman, F. M.; McCormick, F.; Dickson, R. B.; Johnson, M. D.; Lippman, M.; Ethier, S.; Gazdar, A.; Gray, J. W. A Collection of Breast Cancer Cell Lines for the Study of Functionally Distinct Cancer Subtypes. Cancer Cell **2006**, 10 (6), 515–527. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008.
(130) Pastushenko, I.; Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. Trends Cell Biol. **2019**, 29 (3), 212–226. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001.
(131) Grosse-Wilde, A.; d'Hérouël, A. F.; McIntosh, E.; Ertaylan, G.; Skupin, A.; Kuestner, R. E.; Sol, A. del; Walters, K.-A.; Huang, S. Stemness of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival. PLOS ONE **2015**, 10 (5), e0126522. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126522.
(132) Context specificity of the EMT transcriptional response | Nature Communications. https://www.nature.com/articles/s41467-020-16066-2?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-08-20).
(133) Hyun, K.-A.; Koo, G.-B.; Han, H.; Sohn, J.; Choi, W.; Kim, S.-I.; Jung, H.-I.; Kim, Y.-S. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Leads to Loss of EpCAM and Different Physical Properties in Circulating Tumor Cells from Metastatic Breast Cancer. Oncotarget **2016**, 7 (17), 24677–24687. https://doi.org/10.18632/oncotarget.8250.
(134) Chen, C.; Zhao, S.; Karnad, A.; Freeman, J. W. The Biology and Role of CD44 in Cancer Progression: Therapeutic Implications. J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol **2018**, 11 (1), 64. https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5.
(135) Adesione cellulare e segnalazione da parte delle caderine e delle Ig-CAM nel cancro | Nature Reviews Cancer. https://www.nature.com/articles/nrc1276?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-09-25).
(136) Yeeravalli, R.; Kaushik, K.; Das, A. TWIST1-Mediated Transcriptional Activation of PDGFRβ in Breast Cancer Stem Cells Promotes Tumorigenesis and Metastasis. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. **2021**, 1867 (7), 166141. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166141.
(137) Esquer, H.; Zhou, Q.; Nemkov, T.; Abraham, A. D.; Rinaldetti, S.; Chen, Y.-C.; Zhang, X.; Orman, M. V.; D'Alessandro, A.; Ferrer, M.; Messersmith, W. A.; LaBarbera, D. V. Isolating and Targeting the Real-Time Plasticity and Malignant Properties of Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. Oncogene **2021**, 40 (16), 2884–2897. https://doi.org/10.1038/s41388-021-01728-2.
(138) Rønn, L. C.; Berezin, V.; Bock, E. The Neural Cell Adhesion Molecule in Synaptic Plasticity and Ageing. Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci. **2000**, 18 (2–3), 193–199. https://doi.org/10.1016/s0736-5748(99)00088-x.

(139) Taouk, G.; Hussein, O.; Zekak, M.; Abouelghar, A.; Al-Sarraj, Y.; Abdelalim, E. M.; Karam, M. CD56 Expression in Breast Cancer Induces Sensitivity to Natural Killer-Mediated Cytotoxicity by Enhancing the Formation of Cytotoxic Immunological Synapse. Sci. Rep. **2019**, 9, 8756. https://doi.org/10.1038/s41598-019-45377-8.
(140) Taouk, G.; Hussein, O.; Zekak, M.; Abouelghar, A.; Al-Sarraj, Y.; Abdelalim, E. M.; Karam, M. CD56 Expression in Breast Cancer Induces Sensitivity to Natural Killer-Mediated Cytotoxicity by Enhancing the Formation of Cytotoxic Immunological Synapse. Sci. Rep. **2019**, 9, 8756. https://doi.org/10.1038/s41598-019-45377-8.
(141) Neural Cell Adhesion Molecule. Wikipedia; 2025.
(142) Gupta, P. B.; Fillmore, C. M.; Jiang, G.; Shapira, S. D.; Tao, K.; Kuperwasser, C.; Lander, E. S. Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. Cell **2011**, 146 (4), 633–644. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.026.
(143) Jolly, M. K.; Kulkarni, P.; Weninger, K.; Orban, J.; Levine, H. Phenotypic Plasticity, Bet-Hedging, and Androgen Independence in Prostate Cancer: Role of Non-Genetic Heterogeneity. Front. Oncol. **2018**, 8. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00050.
(144) Sellerio, A. L.; Ciusani, E.; Ben-Moshe, N. B.; Coco, S.; Piccinini, A.; Myers, C. R.; Sethna, J. P.; Giampietro, C.; Zapperi, S.; La Porta, C. A. M. Overshoot during Phenotypic Switching of Cancer Cell Populations. Sci. Rep. **2015**, 5, 15464. https://doi.org/10.1038/srep15464.
(145) Aouad, P.; Zhang, Y.; De Martino, F.; Stibolt, C.; Ali, S.; Ambrosini, G.; Mani, S. A.; Maggs, K.; Quinn, H. M.; Sflomos, G.; Brisken, C. Epithelial-Mesenchymal Plasticity Determines Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Dormancy and Epithelial Reconversion Drives Recurrence. Nat. Commun. **2022**, 13 (1), 4975. https://doi.org/10.1038/s41467-022-32523-6.
(146) Gupta, P. B.; Fillmore, C. M.; Jiang, G.; Shapira, S. D.; Tao, K.; Kuperwasser, C.; Lander, E. S. Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. Cell **2011**, 146 (4), 633–644. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.026.
(147) Sellerio, A. L.; Ciusani, E.; Ben-Moshe, N. B.; Coco, S.; Piccinini, A.; Myers, C. R.; Sethna, J. P.; Giampietro, C.; Zapperi, S.; La Porta, C. A. M. Overshoot during Phenotypic Switching of Cancer Cell Populations. Sci. Rep. **2015**, 5, 15464. https://doi.org/10.1038/srep15464.
(148) Williams, E. D.; Gao, D.; Redfern, A.; Thompson, E. W. Controversies around Epithelial–Mesenchymal Plasticity in Cancer Metastasis. Nat. Rev. Cancer **2019**, 19 (12), 716–732. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0213-x.
(149) Satelli, A.; Li, S. Vimentin in Cancer and Its Potential as a Molecular Target for Cancer Therapy. Cell. Mol. Life Sci. CMLS **2011**, 68 (18), 3033–3046. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1.
(150) Sauer, T.; Pedersen, M. K.; Ebeltoft, K.; Naess, O. Reduced Expression of Claudin-7 in Fine Needle Aspirates from Breast Carcinomas Correlate with Grading and Metastatic Disease. Cytopathol. Off. J. Br. Soc. Clin. Cytol. **2005**, 16 (4), 193–198. https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2005.00257.x.
(151) Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2014**, 15 (3), 178–196. https://doi.org/10.1038/nrm3758.
(152) Puisieux, A.; Brabletz, T.; Caramel, J. Oncogenic Roles of EMT-Inducing Transcription Factors. Nat. Cell Biol. **2014**, 16 (6), 488–494. https://doi.org/10.1038/ncb2976.

(153) Edechi, C. A.; Amini, M.; Hamedani, M. K.; Terceiro, L. E. L.; Nickel, B. E.; Leygue, E.; Myal, Y. Comparison of Fixation Methods for the Detection of Claudin 1 and E-Cadherin in Breast Cancer Cell Lines by Immunofluorescence. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. **2022**, 70 (2), 181–187. https://doi.org/10.1369/00221554211055240.
(154) Jolly, M. K.; Somarelli, J. A.; Sheth, M.; Biddle, A.; Tripathi, S. C.; Armstrong, A. J.; Hanash, S. M.; Bapat, S. A.; Rangarajan, A.; Levine, H. Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotypes Promote Metastasis and Therapy Resistance across Carcinomas. Pharmacol. Ther. **2019**, 194, 161–184. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.09.007.
(155) Tőkés, A.-M.; Kulka, J.; Paku, S.; Szik, Á.; Páska, C.; Novák, P. K.; Szilák, L.; Kiss, A.; Bögi, K.; Schaff, Z. Claudin-1, -3 and -4 Proteins and mRNA Expression in Benign and Malignant Breast Lesions: A Research Study. Breast Cancer Res. **2005**, 7 (2), R296. https://doi.org/10.1186/bcr983.
(156) Figure 2. Subcellular localization of claudin 1 in human breast cancer... ResearchGate. https://www.researchgate.net/figure/Subcellular-localization-of-claudin-1-in-human-breast-cancer-cell-lines-A-IF_fig2_330544713 (accessed 2025-08-27).
(157) Exploring new frontiers: cell surface vimentin as an emerging marker for circulating tumor cells and a promising therapeutic target in advanced gastric Cancer | Journal of Experimental & Clinical Cancer Research | Full Text. https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-024-03043-6?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-08-27).
(158) Ostrowska-Podhorodecka, Z.; Ding, I.; Norouzi, M.; McCulloch, C. A. Impact of Vimentin on Regulation of Cell Signaling and Matrix Remodeling. Front. Cell Dev. Biol. **2022**, 10. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.869069.
(159) Evidence for the importance of post-transcriptional regulatory changes in ovarian cancer progression and the contribution of miRNAs | Scientific Reports. https://www.nature.com/articles/s41598-017-08502-z?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-08-27).
(160) Sinha, D.; Saha, P.; Samanta, A.; Bishayee, A. Emerging Concepts of Hybrid Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Progression. Biomolecules **2020**, 10 (11), 1561. https://doi.org/10.3390/biom10111561.
(161) Sankhe, C. S.; Sacco, J. L.; Lawton, J.; Fair, R. A.; Soares, D. V. R.; Aldahdooh, M. K. R.; Gomez, E. D.; Gomez, E. W. Breast Cancer Cells Exhibit Mesenchymal-Epithelial Plasticity Following Dynamic Modulation of Matrix Stiffness. Adv. Biol. **2024**, 8 (9), e2400087. https://doi.org/10.1002/adbi.202400087.
(162) Liao, T.-T.; Yang, M.-H. Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Cancer Metastasis: Clinical Significance and Regulatory Mechanisms. Cells **2020**, 9 (3), 623. https://doi.org/10.3390/cells9030623.
(163) Liu, Q.-Q.; Huo, H.-Y.; Ao, S.; Liu, T.; Yang, L.; Fei, Z.-Y.; Zhang, Z.-Q.; Ding, L.; Cui, Q.-H.; Lin, J.; Yu, M.; Xiong, W. TGF-β1-induced Epithelial-mesenchymal Transition Increases Fatty Acid Oxidation and OXPHOS Activity via the p-AMPK Pathway in Breast Cancer Cells. Oncol. Rep. **2020**, 44 (3), 1206–1215. https://doi.org/10.3892/or.2020.7661.
(164) Il fattore di trascrizione EMT ZEB1 altera il panorama epigenetico delle cellule del cancro del colon-retto | Morte cellulare e malattia. https://www.nature.com/articles/s41419-020-2340-4?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-10-03).
(165) Epigenetic regulation of cancer stemness | Signal Transduction and Targeted Therapy. https://www.nature.com/articles/s41392-025-02340-6?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-10-03).

(166) Liu, Q.-L.; Luo, M.; Huang, C.; Chen, H.-N.; Zhou, Z.-G. Epigenetic Regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition in the Cancer Metastatic Cascade: Implications for Cancer Therapy. Front. Oncol. **2021**, 11, 657546. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.657546.
(167) Ko, C.-C.; Yang, P.-M. Hypoxia-Induced MIR31HG Expression Promotes Partial EMT and Basal-like Phenotype in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based on Data Mining and Experimental Analyses. J. Transl. Med. **2025**, 23 (1), 305. https://doi.org/10.1186/s12967-025-06292-x.
(168) New insights into the ambivalent role of YAP/TAZ in human cancers | Journal of Experimental & Clinical Cancer Research | Full Text. https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-023-02704-2?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-10-03).
(169) The Hippo pathway in cancer: YAP/TAZ and TEAD as therapeutic targets in cancer | Clinical Science | Portland Press. https://portlandpress.com/clinsci/article/136/3/197/230727/The-Hippo-pathway-in-cancer-YAP-TAZ-and-TEAD-as?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-10-05).
(170) Nguyen, C.; Yi, C. YAP/TAZ Signaling and Resistance to Cancer Therapy. Trends Cancer **2019**, 5 (5), 283–296. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.02.010.
(171) Nguyen, C.; Yi, C. YAP/TAZ Signaling and Resistance to Cancer Therapy. Trends Cancer **2019**, 5 (5), 283–296. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.02.010.
(172) Baroja, I.; Kyriakidis, N. C.; Halder, G.; Moya, I. M. Expected and Unexpected Effects after Systemic Inhibition of Hippo Transcriptional Output in Cancer. Nat. Commun. **2024**, 15 (1), 2700. https://doi.org/10.1038/s41467-024-46531-1.
(173) Mukherjee, S.; Warden, E. A.; Zhang, J. YAP/TAZ: An Epitome of Tumorigenesis. Cancer Lett. **2025**, 625, 217806. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.217806.
(174) Il ruolo multiforme dello YAP nel microambiente tumorale e le sue implicazioni terapeutiche nel cancro | Medicina sperimentale e molecolare. https://www.nature.com/articles/s12276-025-01551-9?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-10-05).
(175) Kim, M. H.; Kim, J. Role of YAP/TAZ Transcriptional Regulators in Resistance to Anti-Cancer Therapies. Cell. Mol. Life Sci. CMLS **2016**, 74 (8), 1457–1474. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2412-x.
(176) Liu, T.; Yu, S.; Zhang, L.; Ji, W.; Wang, G.; Wang, N.; Li, M.; Hu, T.; Shi, Z. Yes-Associated Protein 1 in Cancer: Bridging Mechanical Transduction and Epigenetic Regulation. Cancer Biol. Ther. 26 (1), 2562726. https://doi.org/10.1080/15384047.2025.2562726.
(177) Lefebvre, C.; Allan, A. L. Anti-Proliferative and Anti-Migratory Effects of EGFR and c-Met Tyrosine Kinase Inhibitors in Triple Negative Breast Cancer Cells. Precis. Cancer Med. **2021**, 4 (0). https://doi.org/10.21037/pcm-20-62.
(178) Balcioglu, O.; Gates, B. L.; Freeman, D. W.; Hagos, B. M.; Mehrabad, E. M.; Ayala-Talavera, D.; Spike, B. T. Mcam Stabilizes a Luminal Progenitor-like Breast Cancer Cell State via Ck2 Control and Src/Akt/Stat3 Attenuation. NPJ Breast Cancer **2024**, 10, 80. https://doi.org/10.1038/s41523-024-00687-7.
(179) Wang, X.; Thiery, J. P. Harnessing Carcinoma Cell Plasticity Mediated by TGF-β Signaling. Cancers **2021**, 13 (14), 3397. https://doi.org/10.3390/cancers13143397.
(180) Wei, B.; Yang, F.; Yu, L.; Qiu, C. Crosstalk between SUMOylation and Other Post-Translational Modifications in Breast Cancer. Cell. Mol. Biol. Lett. **2024**, 29 (1), 107. https://doi.org/10.1186/s11658-024-00624-3.

(181) Colburn, Z. T.; Jones, J. C. R. Complexes of A6β4 Integrin and Vimentin Act as Signaling Hubs to Regulate Epithelial Cell Migration. J. Cell Sci. **2018**, 131 (14), jcs214593. https://doi.org/10.1242/jcs.214593.