

***Alma Mater Studiorum – Università di Bologna***

**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**Patologia ed Oncologia Sperimentale**

**Ciclo: XXIV°**

**Settore Concorsuale di afferenza: 05/E2 - BIOLOGIA MOLECOLARE**

**Settore Scientifico disciplinare: BIO/11 - BIOLOGIA MOLECOLARE**

**TITOLO TESI**

**Valutazione preclinica di nuovi potenziali bersagli terapeutici per  
la cura del medulloblastoma**

Presentata da: Ester De Marco

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Sandro Grilli**

**Relatore**

**Prof. Andrea Pession**

Esame finale anno 2012

## Indice

1	Introduzione .....	-1-
1.1	Medulloblastoma .....	- 1 -
1.1.1	Epidemiologia ed eziopatologia .....	- 1 -
1.1.2	Classificazione e aspetti istologici.....	- 3 -
1.1.3	Aspetti molecolari del Medulloblastoma .....	- 7 -
1.1.4	Il pathway Sonic-Hedgehog nel Medulloblastoma .....	- 11 -
1.2	Il Gene <i>MYCN</i> .....	- 14 -
1.2.1	. I geni <i>MYC</i> e la loro struttura.....	- 14 -
1.2.2	<i>MYCN</i> : il gene, l'mRNA e la proteina .....	- 17 -
1.2.3	Amplificazione di <i>MYCN</i> nel Medulloblastoma .....	- 19 -
1.3	ACIDO PEPTIDO NUCLEICI .....	- 21 -
1.3.1	Struttura e proprietà chimico-fisiche.....	- 21 -
1.3.2	Il PNA anti-gene (PNAs) .....	- 23 -
1.3.3	Uptake dei PNA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	- 25 -
1.3.4	Applicazioni terapeutiche dei PNA anti-gene.....	- 27 -
1.4	Modelli murini.....	- 29 -
1.4.1	Modelli murini <i>xenograft</i> ortotopici .....	- 29 -
1.4.2	Modelli murini transgenici.....	- 30 -
1.5	Imaging molecolare bioluminescente <i>in vivo</i> .....	- 31 -
2	Scopo della tesi .....	- 37 -
3	Materiali e Metodi .....	- 39 -
3.1	Linee cellulari .....	- 39 -
3.2	Valutazione della crescita cellulare con saggio ATPlite.....	- 41 -
3.3	Trattamento delle cellule con PNAs-NLS anti- <i>MYCN</i> .....	- 43 -
3.4	Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione mediante RT-PCR.....	- 44 -
3.5	Progettazione primers.....	- 46 -
3.6	PCR qualitativa .....	- 47 -
3.7	Reazione di PCR quantitativa Real-Time .....	- 47 -
3.8	Western Blot.....	- 49 -
3.9	Saggio di morte cellulare.....	- 49 -
3.10	Sistema di espressione retrovirale.....	- 50 -
3.10.1	Espressione stabile della luciferasi con sistema retrovirale. - 50 -	-
3.10.2	Trasformazione batterica ed estrazione del DNA plasmidico ... -	-
	52 -	

3.10.3	Trasfezione delle packaging cells (Phoenix) con vettore retro virale	- 52 -
3.10.4	Selezione ed amplificazione delle linee DAOY-D341 e D556...	- 55 -
3.10.5	Saggi di valutazione della bioluminescenza <i>in vitro</i>	- 55 -
3.11	Allevamento di topi NOD/SCID	- 56 -
3.12	Allestimento del modello murino ortotopico <i>xenograft</i>	- 58 -
3.13	Saggi di bioluminescenza <i>in vivo</i>	- 59 -
3.13.1	Cinetica del segnale di bioluminescenza <i>in vivo</i>	- 59 -
3.13.2	Valutazione della crescita tumorale con bioluminescenza	- 60 -
3.14	Trattamento con farmaci Chemioterapici	- 60 -
3.15	Trattamento <i>in vivo</i> con il PNA-NLS anti-MYCN	- 61 -
3.16	Autopsia	- 62 -
3.17	Istologia	- 62 -
4	Risultati	- 65 -
4.1	Valutazione dell'espressione dell'oncogene MYCN	- 65 -
4.1.1	Quantificazione dei livelli di espressione genica di MYCN nelle linee di Medulloblastoma	- 65 -
4.2	Valutazione <i>in vitro</i> del silenziamento genico	- 67 -
4.2.1	Analisi dell'espressione di MYCN in seguito a trattamento con PNA anti-gene anti-MYCN	- 67 -
4.2.2	Valutazione della mortalità cellulare in seguito a trattamento con PNA anti-gene anti-MYCN	- 68 -
4.2.3	Valutazione della vitalità cellulare in seguito a trattamento con PNA anti-gene anti-MYCN	- 69 -
4.2.4	Effetto del trattamento con PNA anti-gene anti MYCN/MYC sulla linea cellulare desmoplastica	- 70 -
4.2.5	Effetto del trattamento con PNA anti-gene anti MYCN/MYC sul sottotipo classico di Mb	- 71 -
4.2.6	Effetto del trattamento con PNA anti-gene anti MYCN/MYC sul sottotipo anaplastico	- 73 -
4.2.7	Caratterizzazione della risposta molecolare dopo trattamento con PNA antigene anti-MYCN	- 75 -
4.3	Modello <i>Xenograft</i> ortotopico di medulloblastoma	- 77 -
4.3.1	Espressione stabile della luciferasi in linee cellulari di medulloblastoma	- 77 -
4.3.2	Valutazione dello spettro d'emissione della luciferasi in linee cellulari di medulloblastoma	- 78 -

4.3.3 Validazione <i>in vitro</i> del segnale di bioluminescenza in linee cellulari di medulloblastoma .....	- 79 -
4.3.4 Sviluppo del modello <i>Xenograft</i> ortotopico di medulloblastoma in bioluminescenza .....	- 80 -
4.3.5 Valutazione della cinetica del segnale di bioluminescenza <i>in vivo</i> .....	- 80 -
4.3.6 Valutazione della crescita tumorale mediante tecnica di bioluminescenza <i>in vivo</i> .....	- 81 -
4.4 Trattamento chemioterapico <i>in vivo</i> .....	- 83 -
4.5 Trattamento <i>in vivo</i> con il PNA-NLS anti- <i>MYCN</i> .....	- 85 -
4.6 Esame istologico .....	- 86 -
5 Conclusioni.....	- 87 -
6 Bibliografia .....	- 91 -

# 1

## Introduzione

---

### **1.1 Medulloblastoma**

#### **1.1.1 Epidemiologia ed eziopatologia**

Il Medulloblastoma (Mb) è il tumore primario pediatrico più comune ed aggressivo del sistema nervoso centrale (SNC), che colpisce in prevalenza nella fascia d'età fra i 5-6 anni ed il 20% dei casi si verifica al di sotto dei due anni, con un rapporto maschio-femmina di 2:1. L'incidenza in età adulta è molto più rara e decresce notevolmente dopo i 45 anni. Si tratta di una neoplasia a rapida crescita, che si sviluppa nel cervelletto, la porzione del sistema nervoso centrale deputata principalmente al controllo dell'equilibrio, situata postero-inferiormente agli emisferi cerebrali, nella cavità del IV° ventricolo.

Le cause d'insorgenza del Medulloblastoma sono ancora sconosciute, ma interessanti progressi si sono fatti con lo studio dei processi biologici.

Sono state riscontrate alterazioni in geni e cromosomi che giocano un ruolo importante nello sviluppo della neoplasia, come mutazioni sul cromosoma 17, individuate in circa metà dei Medulloblastomi o su altri cromosomi quali 1,7,8,9,10q e 16.

Nel 10-30% dei pazienti la neoplasia è metastatica all'esordio con disseminazione neuronale attraverso il liquido cerebro spinale.

Rispetto a tutti i tumori pediatrici del sistema nervoso centrale, il Medulloblastoma, ha una maggiore tendenza anche alla disseminazione extra-neurale e, alla diagnosi, tale diffusione è osservata con una

frequenza che va dal 5-35% dei pazienti, con maggiore incidenza nei pazienti al di sotto dei 3 anni, che rappresentano la categoria a prognosi più sfavorevole. I siti metastatici più frequenti sono: le ossa, il midollo osseo, il fegato, i polmoni ed i linfonodi. In alcuni pazienti si presenta in siti multipli.

La via di disseminazione può essere attraverso il liquido cerebro-spinale, il sistema linfatico o per mezzo dei vasi sanguigni. Quest'ultima più comune dopo resezione chirurgica, in quanto le cellule tumorali possono invadere i vasi circostanti il tumore. Recenti studi hanno altresì dimostrato la presenza di anaplasia nel 40% dei casi di Medulloblastoma con metastasi extra-neurali ed il 60% nei casi di metastasi in generale, così dimostrando che l'anaplasia sia implicata nel processo metastatico e che alcuni medulloblastomi di basso grado possano evolvere verso la variante anaplastica.

Considerando che il sito del Medulloblastoma sia il quarto ventricolo, i sintomi ed i segni di presentazione clinica più comuni sono quelli riferibili ad un aumento della pressione intracranica, poiché il tumore blocca importanti canali di scorrimento del liquido cerebrospinale. La storia tipica comporta iniziale cefalea, vomito, letargia e col passare del tempo si associano difficoltà nel mantenimento della stazione eretta e nella deambulazione. La presenza dei sintomi richiede un approfondimento diagnostico ed attualmente il gold standard per la diagnosi, è una risonanza magnetica.

Oggigiorno si riesce a curare solo il 60% dei pazienti che tuttavia presentano gravi effetti collaterali dovuti alle cure molto aggressive.

Il primo passo della terapia è l'asportazione della massa tumorale, che deve essere il più completa possibile, ma da sola non è sufficiente per ottenere la guarigione, per cui deve essere affiancata da altre terapie quali la radio e chemiterapia. I dati di vecchi studi clinici mostrano infatti che pazienti che avevano ricevuto un intervento chirurgico efficace ma non seguito da altre terapie hanno avuto una ricomparsa del tumore nel 60-70% dei casi, mentre i dati più recenti relativi a pazienti che dopo

l'intervento ricevono la radioterapia mostrano una minore frequenza di recidive. Similmente anche la chemioterapia si ritiene efficace nell'ottenere probabilità migliori di guarigione seppur gravata da importanti effetti collaterali. Attualmente le moderne tecniche pongono la massima attenzione nel minimizzare i possibili effetti a lungo termine della terapia sul sistema nervoso di soggetti in giovane età, in fase di crescita, quali disturbi di memoria e di apprendimento (*L.Kochbati et al. 2006; C.G.Eberhart et al.2003*).

### 1.1.2 Classificazione e aspetti istologici

Vengono attualmente definite sulla base di caratteristiche istologiche e citologiche dalla World Health Organization (WHO) diverse varianti di Medulloblastoma (*D.N.Louis et al.2007; D.Ellison 2010*) (Fig.1):

- Medulloblastoma classico riscontrato sia in età pediatrica che adulta, caratterizzato da piccole cellule con nuclei intensamente colorati disposti in lamine, con raro differenziamento neuroblastico. Questa variante è la più frequente con circa l'80% dei casi;
- Medulloblastoma desmoplastico/nodulare (D/N) e medulloblastoma con estesa nodularità (MBEN) che rappresentano il 15% dei medulloblastomi, con alta prevalenza in età adulta, associato ad una prognosi più favorevole rispetto alla variante classica ed anaplastica/grandi cellule. Caratterizzato da un'elevata nodularità soprattutto nella variante MBEN, con bassa densità cellulare, poca matrice fibrillare e zone internodulari con cellule densamente stipate, con nuclei ipercromici, che

producono una densa rete di fibre reticoliniche, che comunemente mostrano differenziazione neurocitica e sono circondate da abbondante tessuto collagene;

- Medulloblastoma anaplastico o a grandi cellule (A/LC) con nuclei pleiomorfici, prominenti nucleoli, abbondante citoplasma ed intensa attività mitotica, spesso associato a prognosi sfavorevole e disseminazione neurale ed extra-neurale attraverso il liquido cefalorachidiano(CSF);

Le tre varianti precedentemente descritte sono le più comune ma c'è ne sono delle altre, quali:

- Medulloblastoma con differenziazione neuroblastica o neuronale con cellule simili a quelle nervose anormali ;
- Medulloblastoma con differenziazione gliale;
- Medullomioblastoma, forma rara in cui le cellule producono proteine specifiche del muscolo.
- Medulloblastoma melanotico rara forma di Medulloblastoma caratterizzata dalla capacità delle cellule di produrre melanina.
- 

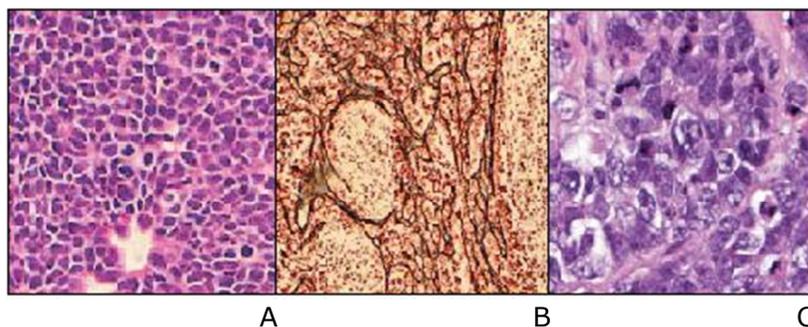
#### Stratificazione dei pazienti sulla base di fattori clinici, patologici e molecolari

La variante istologica incide molto sull'andamento della neoplasia ma risultano altresì importanti, fattori prognostici quali:

- Età del paziente alla diagnosi;
- Sito del tumore e performance neurologica;
- Presenza di tumore dopo resezione chirurgica;
- Presenza di metastasi;
- Amplificazione degli oncogeni *MYCN/MYC*;
- Delezione del braccio corto del cromosoma 17.

Sulla base di questi fattori è possibile definire una terapia e l'outcome della neoplasia considerando pazienti a rischio standard e ad alto rischio valutati col sistema di stadiazione di Chang che risulta essere il migliore per stabilire la prognosi.

I pazienti a rischio standard sono quelli con una età superiore ai 4 anni e\o un tumore non disseminato (Mo) e\o sono stati sottoposti ad una resezione completa o quasi. Generalmente questi vengono sottoposti alla totale resezione chirurgica seguita da chemioterapia e radioterapia, cui solo quest'ultima conferisce una sopravvivenza globale a 5 anni di circa il 50-70%. I pazienti ad alto rischio sono generalmente coloro che hanno una età inferiore a 4 anni, hanno il tumore disseminato (M1-M4) e\o sono stati sottoposti a una resezione chirurgica incompleta (*Kortmann RD, Kuhl J et al.2000*).



**Fig.1 Le tre più comuni varianti istopatologiche di Medulloblastoma: Classica (A), Desmoplastica (D/N-MBEN) (B), e a Larghe Cellule o Anaplastica (LC/A) (C).**

Inoltre una recente classificazione molecolare ha ridistribuito le varianti più comuni di Mb in quattro distinti gruppi: WNT(15%), SHH (25%), e Non WNT/SHH distinti in gruppo C e gruppo D (60%). Tali gruppi sono demograficamente, clinicamente e geneticamente distinti ed identificano una più accurata distribuzione del rischio.

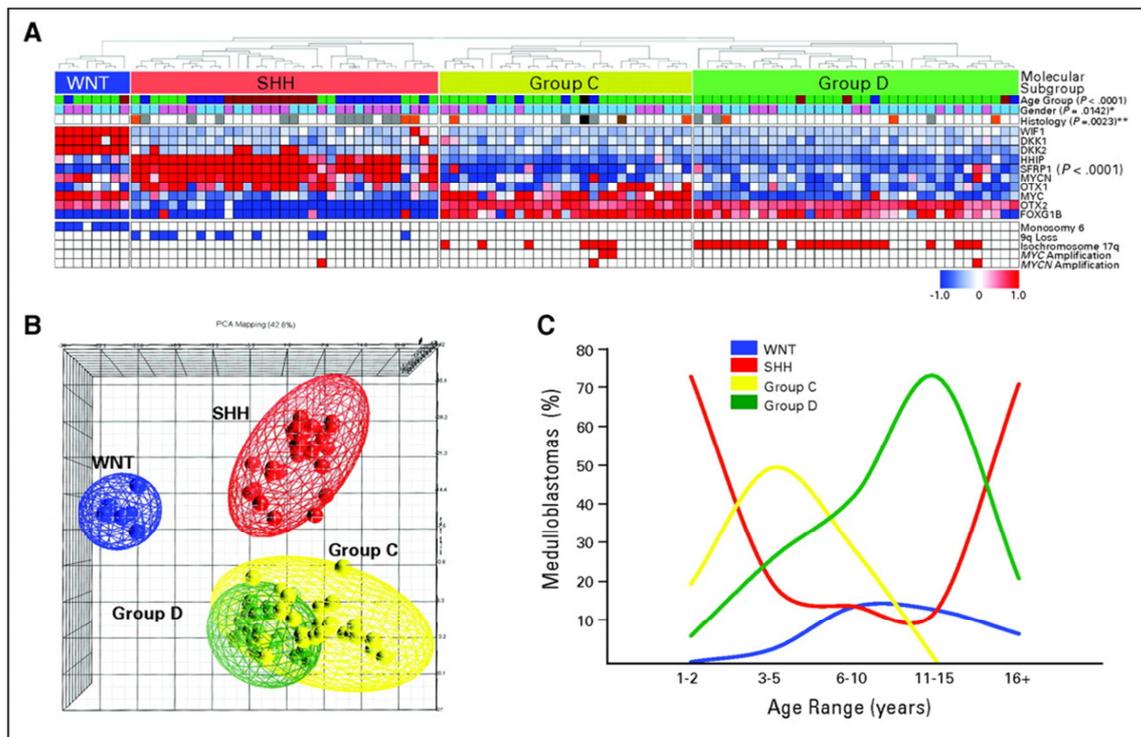
Secondo questa distribuzione, la variante desmoplastica è predominante nel gruppo SHH con una piccola percentuale anche nel gruppo C e D per cui non può essere sempre associata a prognosi migliore perché dipendente dal pathway coinvolto; la variante classica è maggiormente

presente nel gruppo WNT, nel quale non si esclude anche la presenza della variante anaplastica o a grandi cellule (A/LCA) anche se maggiormente presente nei gruppi SHH, C e D ed anche in questo caso l'aggressività è dettata dall'alterazione molecolare alla base. Sebbene i quattro gruppi presentano delle sovrapposizioni è dunque interessante notare che la distribuzione del rischio è basata sull'alterazione molecolare coinvolta associata all'età del paziente e alla presenza di metastasi. Ne deriva che i pazienti appartenenti al gruppo WNT seppur con un Mb A/LCA hanno una prognosi migliore.

Secondo una distribuzione tenente conto dell'età alla diagnosi: il gruppo SHH è distribuito sia tra adulti che bambini, i gruppi WNT e D sono distribuiti tra tutte l'età con buona percentuale anche negli adolescenti, mentre il gruppo C ha il suo picco durante l'infanzia.

Inoltre è stata riconfermata una maggiore aggressività della neoplasia negli uomini piuttosto che nelle donne, con un rapporto di 3.9:1 tra i pazienti ad alto rischio. Questo dato concorda con la presenza di una larga distribuzione dei gruppi con migliore prognosi (WNT e SHH) tra le donne piuttosto che tra gli uomini. Dunque, i bambini appartenenti ai gruppi C/D rappresentano i pazienti con l'outcome peggiore e bassa risposta alla terapia.

Questo nuovo approccio permette di fare una più accurata stratificazione dei pazienti, migliorandone il trail clinico ed aprendo le strade verso una futura target therapy (*P. A. Northcott.2011, M. Remke 2011, D.W.Parsons 2011*).



Northcott P A et al. JCO 2011;29:1408-1414

**Fig.2 Classificazione molecolare dei Mbs. Array expression derivante da 103 Mbs (A), distribuzione dei sottogruppi secondo quanto descritto in(A) (B), distribuzione dei sottogruppi per eta' alla diagnosi(C).**

### 1.1.3 Aspetti molecolari del Medulloblastoma

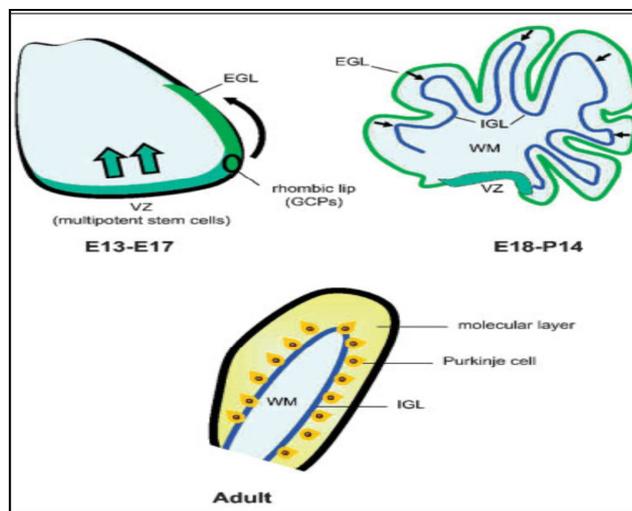
Sebbene le cause del Medulloblastoma siano ancora sconosciute, studiare la biologia del tumore potrebbe portare a migliorare il trattamento clinico della neoplasia e l'identificazione dei fattori di rischio.

Il processo di tumorigenesi riguarda l'alterazione dei normali processi di proliferazione, differenziazione, motilità, morte cellulare e neovascolarizzazione, dati dalla deregolazione di segnali cellulari.

Si ritiene che una vasta percentuale di Medulloblastomi possa avere origine da un'alterazione che porta ad un arresto nel processo di differenziamento a carico di progenitori cellulari neuronali (NSCs), soprattutto di cellule granulari, localizzate nello strato esterno del

cervelletto (EGL). Zona germinale atta alla proliferazione delle cellule originate dal labbro rombico durante lo sviluppo embrionale, con picco di proliferazione ed espansione in fase postnatale.

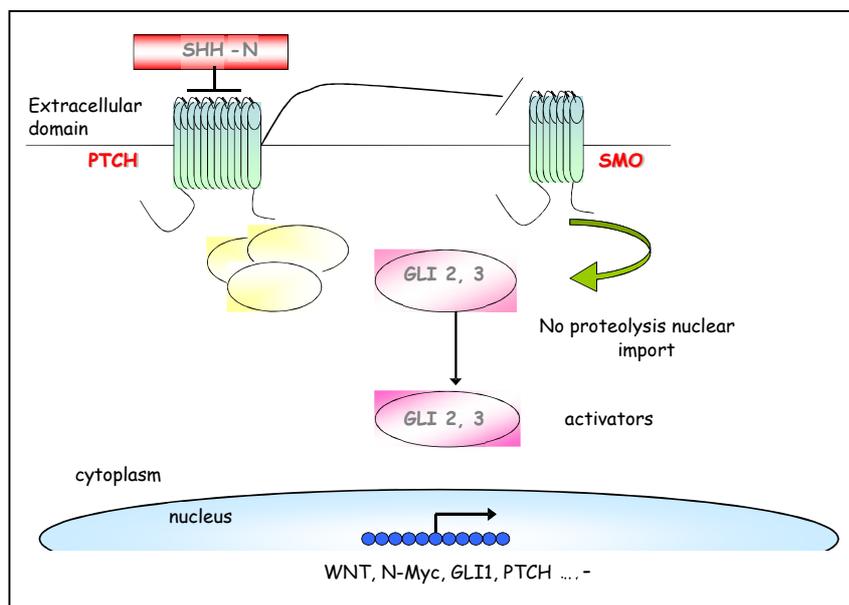
Nello sviluppo del cervelletto l'interazione tra le cellule del Purkinje ed i precursori delle cellule dei granuli (GCPs) è cruciale nell'espansione dei GCP nell'EGL, che migreranno successivamente nello strato interno (IGL), dove abbandoneranno il ciclo cellulare e si differenzieranno in cellule mature dei granuli, che rappresentano la popolazione più abbondante (S. Marino, 2005; T.A. Read, B. Hegedus, 2006) (Fig.3).



**Fig.3 Sviluppo delle cellule mature dei granuli: interazione tra le cellule del Purkinje ed i precursori delle cellule dei granuli (GCPs).**

Mutazioni geniche e cromosomiche ne possono alterare il normale sviluppo, predisponendo ad un più alto rischio di sviluppare il tumore, come nel caso della *Sindrome di Gorlin*: malattia autosomica dominante, con mutazione sul gene *Ptch*, situato sul cromosoma 17, caratterizzata da anomalie scheletriche e disturbi neurologici, oftalmici ed endocrini. Pazienti con tale sindrome vanno in contro a carcinoma delle cellule basali ed il rischio di sviluppare il Medulloblastoma è del 4%, dovuto all'alterazione del pathway di segnale Sonic Hedgehog (Shh)-Patched (Ptch), che è il principale regolatore mitogeno delle cellule progenitrici dell'EGL. Patched, è un recettore che si trova sulla superficie cellulare ed

è attivato da una famiglia di ligandi, della quale Sonic Hedgehog è di principale interesse nel caso del Medulloblastoma. Le cellule neuronali del Purkinje sono i maggiori produttori della glicoproteina Shh nel processo di sviluppo del cervelletto, la quale si legherà al recettore Ptch altamente espresso nelle GPCs dell'EGL, eliminando l'inibizione che quest'ultimo ha su Smoothened (Smo), trasduttore del segnale di Shh. Tale processo porta all'attivazione di geni targets quali *ptch* stesso e la famiglia dei fattori trascrizionali *Gli*.

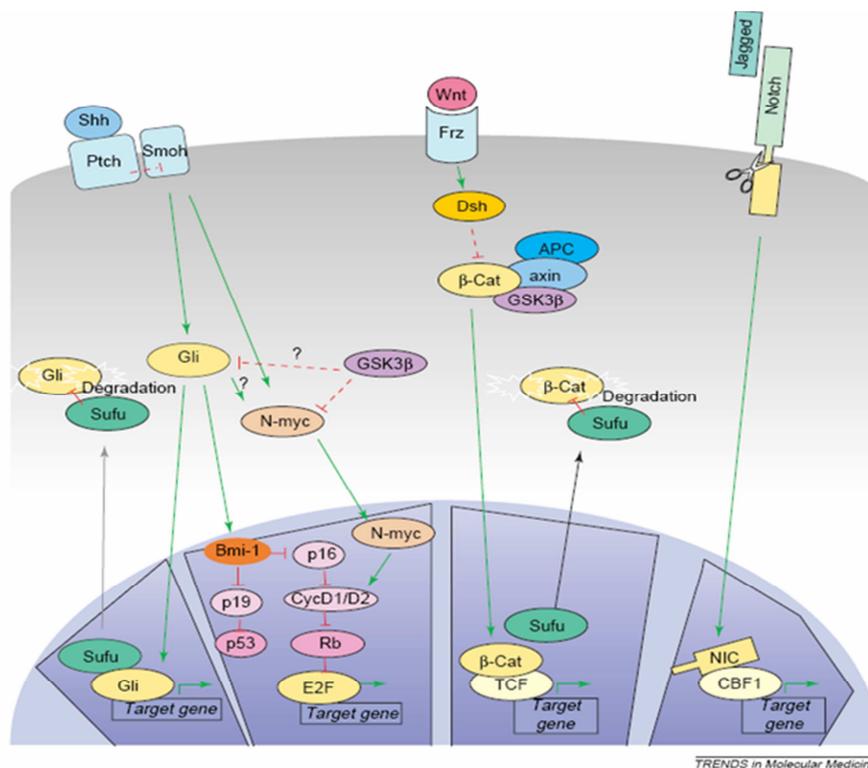


**Fig. 4 Il legame di Shh a PTCH, rilascia la sua inibizione su SMO e promuove la trascrizione genica della famiglia dei geni GLI.**

Studi sperimentali *in vivo* su topo hanno dimostrato l'azione di differenziazione di Shh sui GCPs. Infatti con l'utilizzo di anticorpi verso Shh, il numero di cellule mature dei granuli diminuiva ed altresì topi Gli-1 knockout con una normale crescita cerebellare se indotti con Shh sviluppavano il Medulloblastoma, a conferma dell'attività mitogena di Shh che gioca un ruolo cruciale nel ciclo cellulare inducendo l'espressione delle cicline D1/D2, l'iperfosforilazione di Rb e l'attivazione del fattore di trascrizione E2F, attraverso il gene *MYCN* (Fig.4)

Altre alterazioni sui geni *APC* e *TP53* localizzati sul cromosoma 17, interessano le sindromi di Turcot e Li-Fraumeni. Pazienti con tali sindromi tendono a sviluppare poliposi al colon e tumori cerebrali maligni con un'incidenza di 92 volte superiore rispetto alla normale popolazione.

Il ruolo di *APC* nel pathway *wnt/APC* è di formare un complesso con Axin1, glicogeno kinasi sintasi 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) e  $\beta$ -catenina. Nello stato inattivo il pathway opera una down-regulation dei livelli di  $\beta$ -catenina attraverso una fosforilazione ma con l'attacco di *wnt* al suo recettore Frizzled l'inattivazione viene eliminata ed aumentano i livelli di  $\beta$ -catenina che traslocherà nel nucleo attivando la trascrizione di diversi geni, tra cui anche *MYC*. Simile ruolo è associato al recettore Notch, essenziale per la proliferazione e la differenziazione delle cellule dei granuli. Quando il suo ligando Jagged si lega, Notch attua una proteolisi del suo dominio intracellulare che traslocherà nel nucleo dove si legherà alla proteina CBF1 e dunque al DNA attivando la trascrizione di geni target (Fig.5).



**Fig. 5** Pathway di segnali che regolano la proliferazione dei precursori delle cellule dei granuli nell'EGL.

Un altro pathway alterato riguarda i recettori tirosin-kinasi ErbB-1 (epidermal growth factor receptor), ErbB-2 (HER-2/neu), ErbB-3 ed ErbB-4 che intervengono nella proliferazione, differenziazione e migrazione cellulare. Elevati livelli sono stati riscontrati nel caso di Medulloblastoma, soprattutto di ErbB-2 ed ErbB-4. Il complesso omodimero/eterodimero contenente Erb-2 è un segnale di proliferazione cellulare, ed Erb-4 è altamente espresso sullo strato esterno delle cellule dei granuli, EGL, durante lo sviluppo del cervelletto.

Interessato è anche il pathway di recettori comprendente: nerve growth factor (NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF) che legano p75 e tre Trk (A,B,C), che dimerizzando operano un'up-regulation di vari secondi messaggeri. BDNF interagisce con TrkB promuovendo la sopravvivenza e differenziazione delle cellule dei granuli che esprimono elevati livelli di TrkC. Entrambi TrkB e TrkC sono altamente espressi nei MBs ed attualmente i livelli di TrkC rappresentano un valido indice prognostico, associato a prognosi favorevole (*S. Marino,2005; D.Ellison 2002*).

#### 1.1.4 Il pathway Sonic-Hedgehog nel Medulloblastoma

Lo sviluppo embrionale inizia da una singola popolazione di cellule staminali e culmina con l'organogenesi attraverso stadi di proliferazione, differenziazione e comunicazione tra distinte popolazioni di precursori cellulari. Durante tale evento, forti segnali mitogeni guidano l'espansione delle cellule e limitano la loro capacità differenziativa alla fase G<sub>0</sub> del ciclo cellulare (*R. Matthew, W.A.Weiss,2006*).

La variazione di concentrazione di regolatori chiave, induce la cellula ad uscire dal ciclo cellulare e a differenziarsi; nel caso in cui i progenitori cellulari siano incapaci di fuoriuscire dalla fase proliferativa, questo può portare allo svilupparsi del tumore.

A tal proposito valutare l'espressione differenziale di proteine mitogene può essere utile al fine di identificare il processo di tumorigenesi e l'outcome clinico della neoplasia.

Attualmente il pathway di segnale più coinvolto sembra essere Sonic Hedgehog (Shh)-Patched (Ptch) attraverso l'attivazione di *MYCN*.

Infatti studi effettuati da Knoepfler e collaboratori (*P.S. Knoepfler et al. 2002*) hanno dimostrato che *MYCN* è un regolatore critico nello sviluppo del cervelletto e della corteccia cerebrale. In essi esistono domini in cui *MYCN* è altamente espresso, questo è correlato con un aumento della sintesi del DNA in queste zone. Al contrario la mancanza di *MYCN* corrisponde ad una ridotta sintesi del DNA, associata ad un calo della mitosi e quindi delle dimensioni del dominio, oltre ad un aumento dei livelli cellulari di molecole inibitorie, quali cdk, e ad una alterata espressione nucleare. Ne deriva quindi che *MYCN* è un possibile candidato del meccanismo molecolare responsabile della coordinazione della crescita di regioni del cervelletto e che un'alterazione della sua sintesi può indurre lo sviluppo del tumore.

Infatti la sovraespressione di questa oncoproteina è riscontrabile in almeno 15-35% dei casi di Medulloblastoma spesso associata a forme molto aggressive, quali la variante istologica anaplastica. Probabilmente i livelli cellulari di *MYCN* giocano un ruolo critico nella patogenesi del tumore, soprattutto come marker del segnale di Shh.

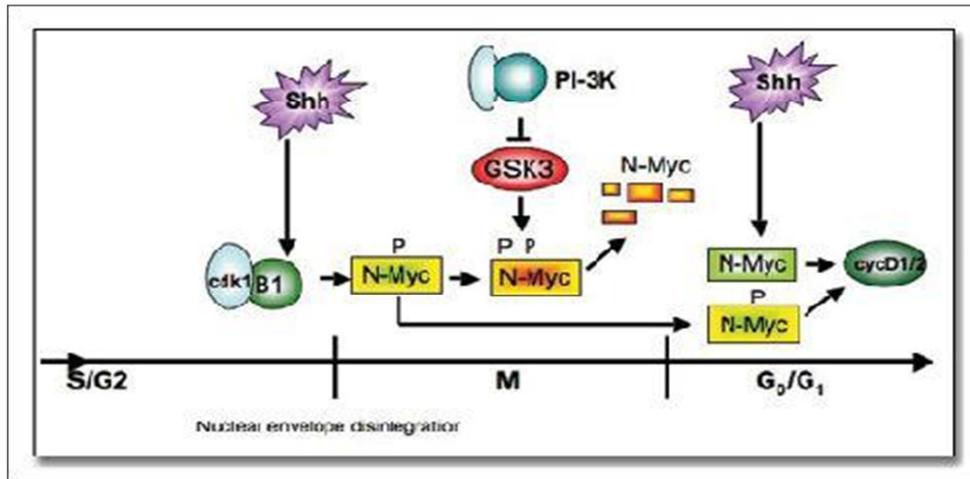
La prima evidenza è stata riscontrata da Pomeroy et al, dove si dimostrava che l'attivazione di Shh nel caso di MB desmoplastico era associato all'incremento di *MYCN*. Successivamente, studi in vitro hanno riportato *MYCN* quale principale effettore mitogeno sui GCPs, in quanto in modelli murini geneticamente ingegnerizzati con delezione di N-myc si verificava un'ipoplasia del cervelletto, suggerendo che fosse la proteina atta alla proliferazione durante il suo normale sviluppo i quali livelli aumentavano attraverso la via di segnale di Shh (*Kenney, A.M. et al. 2003*).

Successivamente, studi effettuati da Xiaohua Su e collaboratori (*Xiaohua Su et al. 2006*) dimostrarono che le cellule dei granuli cerebellari richiedono *MYCN* durante lo sviluppo, in quanto sono particolarmente sensibili ai livelli intracellulari di *MYCN*. Infatti l'overespressione di *MYCN* all'interno di queste, guida tali cellule germinali ad effettuare il proprio sviluppo più precocemente e in cicli cellulari più brevi, inducendo così un più rapido rinnovo di se stesse, ma allo stesso tempo favorendo una maggiore instabilità genetica e quindi il cancro.

Sebbene studi condotti su cervello e pelle dimostrino che il segnale di Shh determini un aumento della trascrizione di *MYCN* (*Rao G, Pedone CA, Valle LD, et al. 2004; Mill P, Mo R, Hu MC, et al. 2005*) è anche chiaro che l'attivazione di Shh conduce ad una stabilizzazione della proteina N-Myc attraverso meccanismi post-trascrizionali riguardanti l'inositolo-3-kinasi (PI3K) (Fig.4).

Quando il segnale di Shh è attivo i livelli di inositolo-3-kinasi sono alti, la glicogeno-sintasi-kinasi-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) è defosforilata dunque inibita, così da non poter fosforilare *MYCN* sul residuo Thr50, destabilizzandola. Similmente, quando il segnale di Shh decresce GSK-3 $\beta$  sarà nella sua forma attiva, fosforilerà *MYCN* che verrà così degradato (*R. Matthew, W.A. Weiss, 2006*).

Ne deriva che, come Shh può svolgere un ruolo di regolazione in questi progenitori cellulari così una deregolazione del suo pathway può indurre lo sviluppo di Medulloblastoma.



**Fig. 6** Illustrazione di come Shh regola la progressione e l'uscita dal ciclo cellulare dei precursori neurali attraverso il coinvolgimento diretto e indiretto di *MYCN*.

## 1.2 Il Gene *MYCN*

### 1.2.1 I geni *MYC* e la loro struttura

La famiglia dei geni *myc* codifica per un gruppo di fosfoproteine nucleari che coordinano diversi aspetti riguardanti sia cellule somatiche che germinali. Sono coinvolte in meccanismi intracellulari quali: proliferazione, regolazione del ciclo cellulare, metabolismo, differenziamento, apoptosi e trasformazione neoplastica; e meccanismi extracellulari riguardanti interazioni con il microambiente che possono evolversi in angiogenesi, invasione ed infiammazione (*Zajak et al., 2001*). La maggior parte degli studi sui geni *MYC* si focalizzano su tre membri che, quando attivati, sembrano essere importanti nello sviluppo di vari tumori umani: *MYC*, *MYCN* e *L-MYC*. Il gene *MYC* è stato scoperto per primo attraverso la sua omologia con *v-MYC*, il gene trasformante del virus MC29 della mielocitosi aviaria. Gli altri due, *MYCN* e *L-MYC*, sono stati scoperti più tardi attraverso la loro omologia con *v-MYC* nelle sequenze amplificate delle cellule, rispettivamente, di neuroblastoma e

del tumore del polmone a piccole cellule . A questa famiglia appartengono almeno altri tre geni: S-MYC, B-MYC e P-MYC. S-MYC e B-MYC appaiono altamente interessanti perché, al contrario di *MYC*, *MYCN* e L-MYC, sembra che le proteine da essi codificate sopprimano la trasformazione neoplastica. Invece P-MYC è uno pseudogene che deriva da una regione di L-MYC.

Studi filogenetici hanno dimostrato che una duplicazione genica avvenuta precocemente nell'evoluzione dei vertebrati, abbia prodotto *MYC* e un'altra linea da cui si sono originati *MYCN* e L-MYC.

I geni MYC possono essere attivati attraverso diversi meccanismi, quali: l'amplificazione genica; la traslocazione cromosomiale; l'inserzione provirale; la trasduzione retrovirale e altri processi non ancora noti.

I membri di questa famiglia svolgono un ruolo nel controllo dell'espressione genica e le evidenze di ciò sono aumentate quando si è visto che la sequenza della proteina c-myc contiene una serie di motivi simili a quelli precedentemente descritti in fattori di trascrizione noti. I primi ad essere identificati sono stati i motivi *leucine-zipper*, come quelli presenti nelle oncoproteine v-Fos e v-Jun, localizzati all'estremità C-terminale della proteina. Subito a monte del motivo *leucine-zipper*, è stato individuato un dominio definito *helix-loop-helix*, già visto in numerosi fattori di trascrizione, quali le proteine E12 e E47. Le proteine Myc contengono anche un tratto di aminoacidi basici a monte del motivo *helix-loop-helix*. Tale motivo, definito "regione basica", è stato precedentemente identificato nel fattore di trascrizione miogenico MyoD, nel quale costituisce la regione coinvolta nel legame sequenza-specifico al DNA. Inoltre si è visto che una regione, presente all'estremità N-terminale di c-myc, ha la capacità di agire come transattivatore trascrizionale .

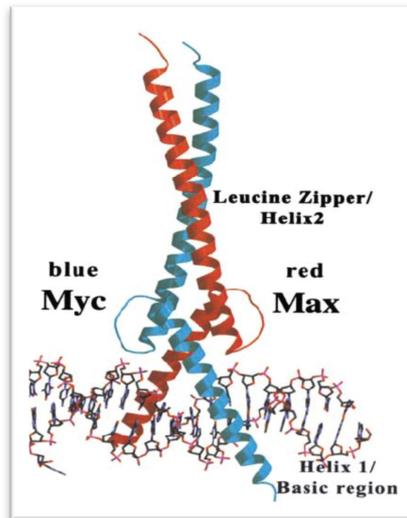
Da alcuni studi è emerso che le proteine Myc possono formare complessi con il DNA solo a concentrazioni molto elevate, indicando che queste interazioni non possono essere fisiologicamente significative. Quindi si è pensato che Myc richiedesse l'interazione con una seconda proteina per

poter svolgere il suo ruolo di fattore trascrizionale. Successivamente è stata identificata una proteina denominata Max .

Max, è una piccola proteina ubiquitaria contenente anch'essa motivi basici *helix-loop-helix* e *leucine zipper*; per questa similitudine strutturale con Myc, la proteina Max è stata considerata un possibile partner di dimerizzazione.

Saggi in vitro hanno dimostrato che Max è in grado di formare complessi dimerici con ciascuno dei membri della famiglia Myc ad una concentrazione minore rispetto a quella necessaria per l'omodimerizzazione di Myc. Durante la fase G<sub>0</sub> l'espressione di Max è elevata e favorisce la formazione di omodimeri Max/Max che reprimono la trascrizione. Al contrario l'aumentata produzione di Myc, che si osserva durante l'ingresso nel ciclo cellulare o come risultato di amplificazione genica, induce l'eterodimerizzazione di MYC/Max. Il dimero MYC-Max così formatosi si lega al DNA in modo specifico alla sequenza palindromica CACGTG, denominata E-box (*Solomon, D.L., B. Amati 1993*) (Fig.6).

Un altro sito di legame al DNA, specifico per N-Myc è costituito dalla sequenza asimmetrica CATGTG. Queste due sequenze non sono esclusive delle proteine Myc, in quanto vengono anche riconosciute da fattori di trascrizione come USF, TFEB e TFE3. Il legame induce l'attivazione trascrizionale di una serie indefinita di geni che promuovono il passaggio dalla fase G<sub>1</sub> alla fase S del ciclo cellulare e quindi, alla crescita cellulare (*Grandori, C. R.N. Eisenman 1997*).



**Fig 7. Struttura dell'eterodimero Myc-Max legato al DNA**

### 1.2.2 MYCN: il gene, l'mRNA e la proteina

L' oncogene *MYCN* è stato identificato nel 1983 in linee di neuroblastoma grazie alla sua parziale omologia (circa il 38%) con il gene *MYC* (*Slamon et al., 1986*).

L'ibridazione in situ ha permesso di mappare *MYCN* sul braccio corto del cromosoma 2 nella regione 2p23-24 (*Schwab, M., et al.*).

Il gene *MYCN* come il resto dei geni appartenenti alla famiglia è composto da tre esoni: il primo non viene trascritto mentre gli altri due codificano per la fosfoproteina nucleare N-Myc. La trascrizione del gene inizia in corrispondenza di diversi siti raggruppati sotto il controllo di due promotori.

Vengono quindi generate due forme di mRNA che differiscono solamente nel primo esone (sequenza leader al 5') ma non negli altri due. Entrambe le forme di mRNA sono instabili ed hanno un' emivita breve di circa 15 minuti (*Shanton et al, 1987*), codificano per proteine rispettivamente di 65 kD e 67 kD localizzate nel nucleo e fosforilate da una caseina chinasi II (CKII), la cui attività è indotta in risposta a mitogeni.

Similmente alle altre proteine della famiglia Myc, N-Myc è organizzata in 3 regioni (Fig.8):

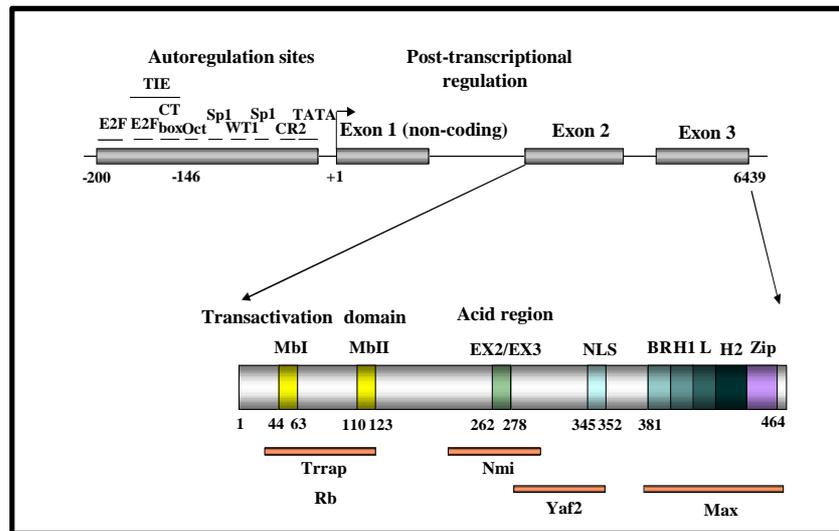
- 1) un dominio di transattivazione all'estremità N-terminale contenente i Myc boxes I e II, regioni ricche in glutamina e prolina ed una regione acida essenziale per tutte le attività biologiche note di N-Myc;
- 2) una regione intermedia non strutturata;
- 3) una regione basica (BR) all'estremità C-terminale coinvolta nel riconoscimento e nel legame specifico con il DNA.

Nonostante l'omologia strutturale e funzionale, l'espressione di *MYCN* e *MYC* è molto differente per quanto riguarda il tessuto, il periodo di sviluppo e il tipo di tumore .

Per esempio *MYC* è abbastanza ubiquitario ed espresso nelle cellule che proliferano, mentre *MYCN* ha un *pattern* di espressione ristretto . Nello sviluppo del topo è stato visto che *MYCN* viene principalmente espresso durante gli stadi precoci del differenziamento: alla nascita è ancora espresso in cervello, rene, intestino, cuore e polmoni, ma in seguito viene *down-regolato*, e nell'adulto la sua espressione si ha soprattutto nelle prime fasi dello sviluppo dei linfociti B .

Nel 1997 Wakamatsu et al. hanno scoperto che, durante lo sviluppo della cresta neurale di embrioni di pollo, *MYCN* è inizialmente espresso nell'intera popolazione cellulare. L'espressione è spenta nel periodo successivo alla colonizzazione dei gangli e del midollo spinale, tranne che per le cellule sottoposte al differenziamento neuronale. L'elevata espressione di *MYCN* provoca una massiva migrazione ventrale della popolazione della cresta neurale e, successivamente, queste cellule migrate nei gangli vanno incontro a differenziamento neuronale. Quindi *MYCN* è coinvolto nella regolazione del destino della cresta neurale in due aspetti: migrazione ventrale e differenziamento neuronale. Inoltre mentre *MYCC* è in grado d'indurre l'apoptosi, qualora venga espresso in modo inappropriato, poco nota è invece l'abilità di *MYCN* nell'indurre la morte cellulare programmata (Leonetti, C., I. D'Agano, et al. 1996, Sakamuro,

D., V. Eviner, et al. 1995; Andrea Pession and Roberto Tonelli, 2005).



**Fig 8. Struttura della proteina N-Myc. Abbreviazioni: MB I, MB II, "Myc-boxes"; BR, basic region; H1-L-H2, helix1-loop-helix2; Zip, leucine zipper; Trrap, transformation/transcription domain-associated protein (Pession e Tonelli, 2005).**

### 1.2.3 Amplificazione di MYCN nel Medulloblastoma

L'amplificazione è uno dei meccanismi con i quali gli oncogeni possono essere attivati per esprimere elevati livelli della proteina e partecipare alla cancerogenesi. Il modello più consistente è stata visto per il neuroblastoma, dove il gene *MYCN* è stato trovato amplificato sia nei tumori che nelle linee cellulari (Schawb, Alitalo et al., 1984; Kohl, Kanda et al., 1983).

Nonostante ciò, l'amplificazione di N-Myc non è ristretta al neuroblastoma, ma riscontrabile in altre forme di tumore con caratteristiche neurali quali: retinoblastoma, Medulloblastoma, astrocitoma, glioblastoma e tumore di Wilms (Strieder, V. and W. Lutz, 2002).

Mediante tecniche di ibridazione *in situ* N-Myc amplificato è stato localizzato in regioni denominate HRS (homogeneously staining regions)

su differenti cromosomi e DM (double minutes) (*Emanuel, Babalan et al., 1985*) e l'unità di amplificazione è probabilmente compresa tra  $2 \times 10^5$  e  $2 \times 10^6$  paia di basi (bp). In alcuni casi il processo di amplificazione potrebbe coinvolgere ricombinazioni somatiche con diversi segmenti di DNA.

Nel caso del Medulloblastoma la trasformazione neoplastica riguarda le cellule dei granuli, popolazione neuronale più abbondante nel cervello.

N-Myc è essenziale nel processo di neurogenesi per la rapida espansione dei progenitori delle cellule dei granuli e per l'inibizione della loro differenziazione.

A prova di ciò, diversi studi su topi che presentano una scissione di *MYCN* nei progenitori cellulari neuronali mostrano ataxia, comportamenti anormali e tremori, inoltre manifestano una diminuzione della massa cerebrale di due volte inferiore al normale e una riduzione di almeno sei volte nella dimensione del cervelletto (*Knoepfler, P.S. Cheng, P. 2002*).

Nel Medulloblastoma l'amplificazione di *MYCN* è stata riscontrata in una percentuale variabile, infatti dal 5 al 15% dei casi mostrano tale aberrazione (*Bayani, J.; Zielenska et al.2000; Aldosari, N.; Bigner 2002*) e in particolare questo evento lo si può riscontrare soprattutto nelle forme di Medulloblastoma desmoplastico (*Pomeroy, S. L.; Tamayo et al,2002*).

*MYCN* nei precursori delle cellule granulari del cervelletto si presenta come un bersaglio diretto del pathway di Sonic Hedgehog (Shh), infatti *MYCN* è up-regulated dal segnale di Shh che funziona da regolatore nella progressione del ciclo cellulare. Nell'uomo, mutazioni a carico di Patched1 (PTCH), antagonista del segnale di Shh, provocano la sindrome di Gorlin, malattia che manifesta un aumento di incidenza di Medulloblastoma (*Rouah, E.; Wilson, D. R.; Armstrong, 1989*). A ciò vi si aggiunge che il 20-30 % dei casi di Medulloblastoma sporadici presentano mutazioni di PTCH e di altri elementi coinvolti nella via di Shh (*Raffel, C.; Jenkins,1997; Taylor, M. D.; Liu, L. 2002*).

Inoltre, recentemente si è identificato un altro gruppo di medulloblastomi (gruppo D) in cui vi è il coinvolgimento di *MYCN* in termini di over-espressione o amplificazione (*P. A. Northcott.2011*).

Risulta dunque molto interessante studiare quale potrebbe essere il riscontro nei medulloblastomi interessati in una deregolazione dell'oncogene *MYCN* dopo una sua inibizione.

## 1.3 ACIDO PEPTIDO NUCLEICI

### 1.3.1 Struttura e proprietà chimico-fisiche

I PNA sono analoghi sintetici degli acidi nucleici, in cui il normale scheletro fosfodiesterico è sostituito da una catena pseudo-peptidica formata da monomeri di N-(2-amminoetil)glicina. Le basi azotate sono legate covalentemente a questa struttura poliammidica attraverso un ponte metilen-carbonilico (*Nielsen, Egholm et al. 1991*).

Nonostante queste modificazioni rispetto agli acidi nucleici naturali, i PNA si legano in modo sequenza-specifico al DNA e all'RNA secondo le regole di appaiamento di Watson-Crick (*Egholm, Buchardt et al. 1993*). I PNA possono ibridizzare con sequenze complementari di DNA o RNA, secondo due schemi:

- PNA contenenti le quattro basi azotate naturali ibridizzano con gli acidi nucleici complementari seguendo le regole di appaiamento delle basi di Watson-Crick. Risultato dell'appaiamento è un *duplex* PNA/DNA o PNA/RNA che assomiglia alla forma B del DNA (*Brown, Thomson et al. 1994; Wittung, Nielsen et al. 1994*);
- PNA contenenti solo pirimidine (T o C) possono ibridizzare con sequenze complementari di DNA a doppio filamento. In questo caso, il PNA invade la doppia elica del DNA e ibridizza con la sequenza target, mentre il secondo filamento di DNA viene allontanato e forma un "D" loop (*Nielsen, Egholm et al. 1991*). Si forma così un *triplex*

PNA/DNA/PNA, in cui una parte del PNA si lega alla sequenza *target* secondo le regole standard di appaiamento di Watson-Crick, mentre l'altra porzione del PNA forma il terzo filamento del *triplex* con un appaiamento Hoogsteen (Egholm, Buchardt et al. 1993; Nielsen, Egholm et al. 1994).

I PNA sono molecole non ioniche e achirali, e la mancanza di repulsione elettrostatica tra i filamenti rende i *duplex* ibridi PNA/DNA e PNA/RNA maggiormente stabili rispetto ai naturali omo- ed etero-*duplex* (Egholm, Christensen et al. 1995); non sono substrato di enzimi idrolitici come proteasi e nucleasi, perciò non vengono degradati nelle cellule e sono estremamente stabili nei fluidi biologici (Demidov, Potaman et al. 1994).

Poiché i PNA e il DNA non hanno gruppi funzionali in comune ad eccezione delle basi azotate, le loro caratteristiche chimiche differiscono in modo significativo da quelle del DNA.

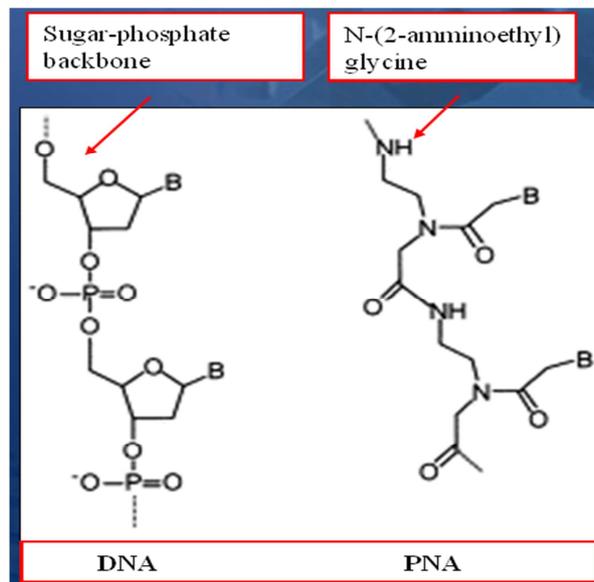
Sono composti neutri e quindi hanno una scarsa solubilità in acqua rispetto al DNA. Le molecole neutre di PNA hanno la tendenza a formare aggregati in modo dipendente dalla sequenza nucleotidica. La solubilità del PNA è legata anche alla lunghezza dell'oligomero e al rapporto purine: pirimidine (Hyrup and Nielsen 1996). Alcune modificazioni, inclusa l'incorporazione di residui di lisina carichi positivamente, hanno mostrato un miglioramento nella solubilità. Per aumentare la solubilità in acqua, possono anche essere introdotte cariche negative, specialmente nelle chimere PNA-DNA.

I coefficienti di estinzione dei monomeri dei PNA non sono ben caratterizzati come quelli di DNA e RNA. Ci si aspetta che gli oligomeri dei PNA abbiano coefficienti di estinzione diversi dalle loro controparti DNA e RNA, poiché lo scheletro peptidico dovrebbe perturbare diversamente il sistema  $\pi$  delle nucleobasi. Per questo motivo, per tutti gli scopi pratici la concentrazione di un oligomero PNA è determinata misurando l'assorbanza a 260 nm a 80°C (Kuhn, Demidov et al. 1998). A tale temperatura, le basi azotate sono considerate completamente distaccate

e la perturbazione del sistema  $\pi$  da parte dello scheletro peptidico si assume meno importante.

Le proteine che riconoscono il DNA non interagiscono con i PNA della stessa sequenza nucleotidica, probabilmente per la mancanza delle interazioni elettrostatiche con lo scheletro (Kurg, Langel et al. 2000).

L'ibridizzazione PNA-acido nucleico è molto sensibile ai *mismatch*, infatti si è visto che i PNA si legano preferenzialmente alle sequenze complementari, più debolmente a quelle che contengono un *mismatch* e non si appaiano a quelle contenenti due *mismatch* (Nielsen, Egholm et al. 1993).



**Fig.9 DNA ed acidi peptido nucleici: strutture a confronto**

### 1.3.2 Il PNA anti-gene (PNAs)

I PNA sono in grado di bloccare l'espressione genica attraverso due meccanismi:

- inibizione della trascrizione attraverso il legame al DNA (strategia anti-gene);

- inibizione della traduzione attraverso il legame all'mRNA (strategia antisenso).

I PNA antigene possono arrestare il processo trascrizionale grazie alla loro capacità di invadere la doppia elica del DNA e formare un complesso o una stabile struttura *triplex*. I PNA possono legarsi al DNA per inibire l'iniziazione e l'allungamento della RNA polimerasi (Hanvey, Peffer et al. 1992; Boffa, Morris et al. 1996; Tyler, Jansen et al. 1999). Essi possono anche essere progettati per legarsi ai siti di legame per i fattori di trascrizione all'interno del promotore, inibendo in questo modo il legame e l'azione dei corrispondenti fattori di trascrizione (Vickers, Griffith et al. 1995). I PNA contro la regione del promotore possono formare un complesso stabile PNA-DNA che riduce l'accesso al DNA alla polimerasi. I complessi PNA-DNA localizzati lontano a valle del promotore, possono anche bloccare efficientemente la progressione della polimerasi e l'allungamento della trascrizione e perciò produrre mRNA troncati. I *triplex* PNA<sub>2</sub>/DNA arrestano la trascrizione in vitro e sono capaci di agire come un agente anti-gene (Ray and Norden 2000).

In condizioni saline fisiologiche, il legame dei PNA al DNA plasmidico supercoiled è più veloce di quello al DNA lineare (Bentin and Nielsen 1996). Questo risultato è relativo al fatto che di solito il DNA cromosomico trascrizionalmente attivo è superavvolto negativo e può agire come un migliore target per il legame del PNA in vivo. Inoltre si è visto che il legame del PNA al DNA a doppio filamento aumenta mentre il DNA viene trascritto.

La strategia anti-gene ha il vantaggio, rispetto a quella antisenso, di bloccare il gene di interesse ancora prima che esso venga trascritto: il PNA anti-gene si può quindi utilizzare a concentrazioni molto minori, e mostra un effetto inibitorio più forte e prolungato nel tempo rispetto a quello antisenso (Pession and Tonelli 2005).

### 1.3.3 Uptake dei PNA *in vitro* e *in vivo*

Lo scarso *uptake* cellulare dei PNA è considerato il maggiore ostacolo nella prospettiva di utilizzare i PNA come agenti terapeutici.

Usando vescicole fosfolipidiche (liposomi) come modello di membrane cellulari, Wittung e collaboratori hanno dimostrato che i PNA hanno un velocità di efflusso dai liposomi molto lenta ( $t_{1/2}$  di 5,5 e 11 giorni per due PNA di 10 nucleotidi) (Wittung, Kajanus et al. 1995). Da questi esperimenti si conclude che l'entrata dei PNA nelle cellule, per diffusione passiva, è molto lenta. Anche in altri studi, è stato dimostrato che l'entrata dei PNA in alcune cellule e linee cellulari è eccessivamente lenta o addirittura non individuabile.

In contrasto, numerosi gruppi hanno trovato che alcune cellule sono soggette all'entrata dei PNA, suggerendo specifici meccanismi di trasporto per queste molecole (Tyler, Jansen et al. 1999). E' stato riportato, in studi sia *in vitro* sia *in vivo*, che i PNA entrano nelle cellule neuronali di ratto. In neuroni di ratto in coltura, non solo i PNA sono assorbiti dalle cellule, ma mostrano anche un'inibizione dell'espressione dei geni *target*, dipendente dal tempo e dalla dose (Aldrian-Herrada, Desarmenien et al. 1998). L'*uptake* da parte dei neuroni è stato mostrato anche *in vivo*. Quando iniettati nel cervello del ratto, i PNA sono in grado di diminuire l'espressione del gene *target* mostrando un'attività antisenso (Tyler, McCormick et al. 1998). Inoltre, numerosi gruppi hanno dimostrato che, iniettati endovena o intraperitoneo, i PNA possono attraversare la barriera emato-encefalica ed entrare nei neuroni, provocando una risposta antisenso (Aldrian-Herrada, Desarmenien et al. 1998; Tyler, Jansen et al. 1999).

Quindi l'*uptake* dei PNA sembra dipendere dal tipo cellulare. Infatti successivamente si è visto che usando elevate concentrazioni di PNA e lunghi tempi di incubazione, è possibile indurre l'*uptake* di PNA anche da

parte di mioblasti, fibroblasti, linfociti e altri tipi cellulari (*Ray and Norden 2000; Sei, Yang et al. 2000*).

Per facilitare l'*uptake* dei PNA nelle cellule eucariotiche sono stati proposti numerosi metodi:

- permeabilizzazione della membrana cellulare con lisolectina (*Boffa, Morris et al. 1996*) o detergenti come Tween (*Norton, Piatyszek et al. 1996*);
- temporanea permeabilizzazione con streptolisina O (*Faruqi, Egholm et al. 1998*);
- modificazione dei PNA con motivi idrofobici (*Branden, Mohamed et al. 1999*);
- impiego di vescicole di trasporto, quali i liposomi;
- coniugazione del PNA a ligandi recettoriali o ad anticorpi che inducono l'endocitosi recettore-mediata dei rispettivi coniugati (*Basu and Wickstrom 1997*);
- coniugazione con peptidi che promuovono la traslocazione attraverso la membrana cellulare (*Pooga, Hallbrink et al. 1998*) e il *targeting* in compartimenti specifici (*Cutrona, Carpaneto et al. 2000*). La classe dei CPP (*cell penetratine peptides*) sta crescendo rapidamente. Studi differenti hanno dimostrato che penetratina (*Derossi, Joliot et al. 1994*) e trasportano (*Pooga, Hallbrink et al. 1998*) sono in grado di trasportare i PNA attraverso la membrana citoplasmatica in cellule eucariotiche. Inoltre costrutti PNA-NLS (*nuclear localisation signal*) aumentano l'*uptake* cellulare dei PNA e facilitano il loro trasporto dal citoplasma al nucleo (*Cutrona, Carpaneto et al. 2000*). Il PNA anti-gene coniugato con il peptide

NLS, creato per l'inibizione selettiva del gene *MYCN* in cellule di neuroblastoma umano (GI-LIN e IMR-32: *MYCN* amplificato ed sovraespresso; SJ-N-KP e NB-100: *MYCN* non amplificato e poco espresso), causa inibizione della trascrizione, inibizione dell'espressione proteica, inibizione della crescita cellulare: le cellule si fermano in G1, e vanno poi incontro ad apoptosi. Il suo effetto inibitorio nei confronti della trascrizione del gene *MYCN*, è altamente specifico e selettivo (*Pession, Tonelli et al. 2004*).

- legame del PNA ad una sequenza di DNA in una catena oligonucleotidica lineare e coniugazione della chimera PNA/DNA con lipidi cationici (*Hamilton, Simmons et al. 1999*);
- microiniezione (*Hanvey, Peffer et al. 1992*), elettroporazione.

#### 1.3.4 Applicazioni terapeutiche dei PNA anti-gene

L'elevata stabilità a livello cellulare, dovuta per di più alla loro struttura ed alla loro assenza di carica, e la capacità di definire appaiamenti abbastanza stabili con il DNA, garantiscono agli acidi peptido nucleici un ruolo terapeutico rilevante nella cura a diverse neoplasie. PNA diretti contro gli *early-gene* E6-E7 di papilloma virus, responsabile di circa il 100% dei tumori alla cervice, ripristinano le normali funzioni di geni quali pRB e p53 (normali bersagli del virus) e attribuiscono un fenotipo normale a cellule HeLaS (*Braun K. et al. 2004*).

Ulteriori evidenze terapeutiche sono state riscontrate in cellule di carcinoma prostatico dove PNA diretti verso il gene *c-myc* ne inibiscono la trascrizione e la traduzione a 24, 48 e 72 ore oltre a definire una diminuzione della crescita cellulare (*Boffa L. et al. 2000*).

Ed ancora inibizione selettiva di regioni enhancer E $\mu$  responsabili dell'overespressione di c-myc in linee di linfoma di Burkitt (BL) ha definito arresto del ciclo cellulare in G1 phase, nonché blocco nell'espressione del suddetto gene (*Cutrona G. et al. 2003*).

L'efficacia di PNA anti-gene è stata saggiata anche in diverse linee cellulari di neuroblastoma. Sun e collaboratori hanno dimostrato come tali antisenso di terza generazione coniugati ad analoghi della somatostatina (SSA), riescano a penetrare in zona nucleare, ad inibire selettivamente l'espressione di *MYCN* in linee IMR-32 e ad arrestarne la crescita (*Sun L. 2002*).

Studi recenti hanno inoltre dimostrato come PNA coniugati a specifiche sequenze di localizzazione nucleare (NLS) definiscano effetti più evidenti in linee di neuroblastoma *MYCN amplified* rispetto a quelle *non-amplified*. L'arresto del ciclo cellulare in G1 phase risulta infatti più pronunciato in linee quali IMR-32 e GI-LI-N (80-90%) rispetto a linee contenenti un minor numero di copie del gene bersaglio (50-60% per SJ-N-KP e NB-100).

Tale rapporto si rispecchia inoltre nel calo dell'espressione di *MYCN* a 24, 48 e 72 e nel concomitante ingresso in apoptosi (*Pession et al. 2004*).

Gli evidenti risultati terapeutici ottenuti da studi *in vitro* hanno posto le basi per un successiva sperimentazione *in vivo*.

Studi di farmacocinetica hanno evidenziato assenza di tossicità di tale molecola a lungo e breve termine in modelli murini di Linfoma di Burkitt; la molecola permane inoltre nei tessuti, ed in particolare in quello tumorale per almeno 600 minuti a concentrazioni che *in vitro* inibiscono il BL.

## 1.4 Modelli murini

I modelli animali sono oggi, ampiamente utilizzati nel campo della ricerca oncologica in quanto permettono di studiare in modo approfondito le cause della patologia e di testare possibili nuovi trattamenti. Il topo (*mus musculus*) è uno degli animali più utilizzati a tale scopo in quanto è uno dei migliori sistemi modello per la ricerca sul cancro, grazie ad alcune caratteristiche quali la taglia, la facilità a riprodursi in cattività, la durata della vita, e la similarità molecolare e fisiologica con l'uomo (Frese KK. et al., 2007).

Nella ricerca di possibili farmaci per la cura del medulloblastoma, lo sviluppo di modelli preclinici risulta fondamentale. I modelli murini elaborati nel corso del tempo sono numerosi, diversi in complessità e tempo di realizzazione.

### 1.4.1 Modelli murini xenograft ortotopici

I modelli *xenograft* sono modelli derivati dall'impianto di cellule tumorali umane in topi immunocompromessi. Le cellule tumorali possono derivare da linee cellulari di origine tumorale, o da tumori umani primari. L'impianto di cellule tumorali può essere eseguito in sede ectopica, o nel sito naturale di sviluppo del tumore, in questo caso si parla di modello *xenograft* ortotopico (Sharpless et al. 2006). Esistono diverse varianti di modelli *xenograft* ortotopici. Nello studio delle patologie ematologiche le cellule tumorali possono essere trapiantate nel midollo osseo o negli organi linfatici mediante iniezione endovenosa. Anche cellule derivanti da tumori solidi possono essere inoculate per via endovenosa per indurre metastasi nel polmone o in altri siti. Inoltre cellule tumorali possono essere inoculate *in situ*, in organi come cervello, reni, polmoni per valutare meglio le interazioni fisiologiche tra le cellule e lo stroma. Anche il trapianto ortotopico di tumori umani primari potrebbe risultare predittivo

per lo studio di tumori umani di cui non sono disponibili colture cellulari. Questi modelli *xenograft* sono largamente utilizzati nella ricerca oncologica e preclinica per via del basso costo, dei ridotti tempi di latenza e dell'adattabilità a diverse tipologie di tumori. Tuttavia, i modelli *xenograft* presentano delle problematiche e delle limitazioni e sono considerati spesso modelli inadeguati e poco predittivi per lo studio dell'efficacia di nuovi agenti terapeutici. Nonostante ciò, il modello *xenograft* ortotopico è ancora fondamentale per gli studi preliminari nello sviluppo di nuovi farmaci e numerosi studi clinici dimostrano che l'inefficacia di nuovi farmaci nei modelli *xenograft* corrisponde quasi sempre al fallimento della terapia in clinica (Frese KK. et al., 2007).

#### 1.4.2 Modelli murini transgenici

I modelli transgenici sono i modelli animali più sofisticati e possono essere divisi in modelli transgenici e in modelli transgenici endogeni. I topi transgenici sono animali geneticamente ingegnerizzati che esprimono oncogeni (o non esprimono oncosoppressori) in modo non fisiologico, in quanto posti sotto controllo di promotori o enhancer ectopici esogeni. I modelli transgenici endogeni, invece sono animali geneticamente modificati che esprimono oncogeni o non esprimono oncosoppressori grazie a tecniche di knockin e knockout e quindi sfruttano promotori endogeni. Ad esempio si può usare la tecnologia delle ricombinasi *cre* che permette l'espressione o la delezione tessuto specifica sfruttando promotori murini endogeni. Inoltre per meglio simulare l'insorgenza del tumore sono stati messi a punto modelli condizionali che sfruttano promotori tessuto-specifici attivabili o reprimibili secondo necessità. I modelli transgenici, sebbene ricapitolino meglio la tumorigenesi, sono piuttosto complessi e difficili da realizzare, in quanto necessitano della manipolazione genica in embrioni e cellule gametiche.

## 1.5 Imaging molecolare bioluminescente *in vivo*

Al momento attuale, l'indagine delle alterazioni molecolari presenti in molte malattie è perseguita mediante test genetici, esami del sangue specifici e analisi istopatologiche. Inoltre moltissime diagnosi sono effettuate solo in seguito alla comparsa dei primi sintomi. In tali casi quindi si giunge ad un riconoscimento tardivo dello stato di malattia.

Sono dunque necessari nuovi metodi non invasivi che permettano di ottenere allo stesso tempo informazioni morfologiche, funzionali e biochimiche per la caratterizzazione precoce di alterazioni molecolari; occorrono delle tecniche di Imaging Molecolare.

Il termine Imaging Molecolare, coniato nel 1990, definisce la rappresentazione visuale, la caratterizzazione e la quantificazione di processi biologici a livello cellulare e subcellulare, all'interno di organismi viventi "intatti".

I sistemi di Imaging più utilizzati sono la tomografia computerizzata a raggi-X (CT), la risonanza magnetica (MRI), la spettroscopia a risonanza magnetica (MRS), la tomografia a emissione di positroni (PET o microPET) e l'imaging ottico molecolare, che comprende la fluorescenza e la bioluminescenza (BLI).

L'imaging con bioluminescenza è un sistema reporter basato su una reazione enzimatica catalizzata dalla proteina luciferasi, enzima che genera luce nel campo del visibile ossidando il proprio substrato, la D-luciferina, ad ossiluciferina, in sistemi viventi (*Sadikot et al. 2005*).

### 1.5.1 La bioluminescenza *in vivo*

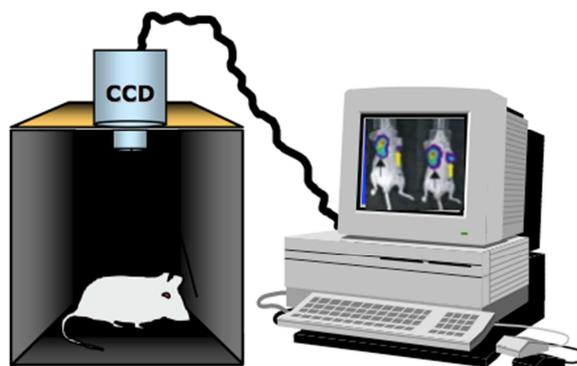
In natura esistono vari sistemi bioluminescenti ognuno caratterizzato da uno specifico sistema enzimatico. Il sistema bioluminescente più usato in

ricerca scientifica è la luciferasi della lucciola del Nord America (*Photinus pyralis*; FLuc), ma sono state identificate diversi cloni di luciferasi dalle meduse (*Aequorea*), dalla sea pansy (*Renilla*), dai coralli (*Tenilla*), dall'elaterio (*Pyrophorus plagiophtalamus*) e da vari batteri come *Vibrio fischeri* e *V. harveyi*.

La luciferasi è un marker eccellente per l'espressione genica perchè manca di modificazioni post-traduzionali ed ha un tempo di dimezzamento ( $t_{1/2}$ ) *in vivo* di circa 3 ore. La luciferasi della lucciola genera fotoni attraverso la seguente reazione:



La luce emessa è ad ampio spettro (530-640 nm) con il picco d'emissione a 562 nm. Questo spettro di emissione, accoppiato alla proprietà ottiche dei tessuti, permette alla luce di penetrare attraverso diversi centimetri di tessuto. E' così possibile rilevare luce emessa da organi interni di piccoli mammiferi che esprimono la luciferasi come gene reporter. I fotoni vengono rilevati da speciali camere CCD (*charge coupled device*) che convertono i fotoni in elettroni. La CCD camera codifica spazialmente l'intensità dei fotoni incidenti in pattern di carica elettrica per generare un'immagine. Queste camere sono comandate da un computer per l'acquisizione dell'immagine e per l'analisi (Figura 10).



**Figura 10. Rappresentazione schematica del luminografo**

La reazione catalizzata dalla luciferasi è una complessa interazione tra ATP, ossigeno e luciferina (substrato esogeno). Poiché è necessaria la presenza dell'ATP, la reazione avviene solo nelle cellule metabolicamente attive, che contengono la luciferasi. L'intensità del segnale luminoso dipende da vari fattori, come il livello di espressione della luciferasi, la concentrazione del substrato, la lunghezza d'onda della luce generata, la sensibilità del sistema di rilevazione e la localizzazione delle cellule marcate all'interno dell'organismo.

In generale l'intensità del segnale decresce di circa 10 volte per ogni centimetro di tessuto attraversato (*Rehemtulla et al. 2000*).

La BLI è ampiamente utilizzata nella ricerca oncologica, in quanto utile per identificare metastasi e per misurare la proliferazione di cellule tumorali che esprimono la luciferasi. Alcuni studi fatti utilizzando cellule HeLa luminescenti iniettate nella vena caudale di topi immunodeficienti hanno dimostrato l'utilità della BLI nell'individuazione precoce di metastasi al polmone (*Suditok R. et al. 2005*). In modo simile altri studi hanno dimostrato che la bioluminescenza è una potente metodologia per la comprensione della patogenesi della malattia *in vivo*. È stato dimostrato che la rilevazione di cellule tumorali presenti in organi interni tramite BLI ha una sensibilità almeno pari a quella della tomografia ad emissione di positroni (PET), inoltre rispetto alla PET, che richiede traccianti radioattivi e tossici, la BLI richiede la sola somministrazione di D-luciferina, assolutamente atossica anche in cuccioli neonati (*Dohlen G. et al., 2008*).

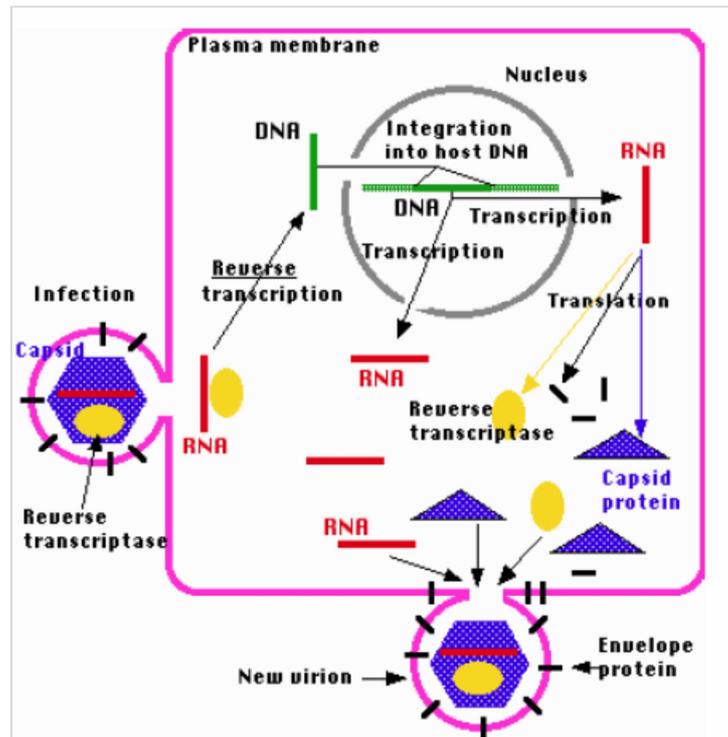
In conclusione, la BLI può essere considerata una potente metodica di indagine e diagnosi preclinica, tuttavia analisi quantitative devono essere fatte con cautela ed è necessaria la validazione di ogni applicazione specifica.

### 1.5.2 Trasfezione stabile di linee cellulari mediante vettori retrovirali

L'espressione stabile di geni eterologhi in cellule di mammifero può essere ottenuta mediante l'utilizzo di retrovirus ricombinanti. I retrovirus più comunemente utilizzati e studiati sono quelli appartenenti alla famiglia dei *Retroviridae*. Tali retrovirus sono modificati in modo da perdere la capacità replicativa, poiché privi di alcuni geni espressi nei ceppi wild type. Questi virus permettono l'integrazione stabile di transgeni nel genoma di cellule eucariotiche, consentendone l'espressione stabile (*Blesch et al. 2003*).

I retrovirus sono virus il cui genoma è costituito da un singolo filamento di RNA delle dimensioni di circa 10Kb, contenente tre geni essenziali, *gal*, *pol*, *env* che codificano rispettivamente per le proteine del core, della trascrittasi inversa e del capsido, e da una regione  $\Psi$  per l'impacchettamento. A ciascuna estremità vi sono LTR (long terminal repeats), sequenze implicate nell'integrazione, e regioni promotori ed enhancers. LTRs consistono in tre regioni: U3, R, e U5. Il 5' della regione R è definito come la sequenza segnale di inizio trascrizione nel 5' LTR, mentre la regione U3 contiene il promotore ed elemento enhancer. Inoltre la regione U3 contiene il segnale di poliadenilazione. Durante la retrotrascrizione la regione U3 al 3'LTR e la regione U5 al 5'LTR dell'RNA virale sono duplicate. Una volta infettata la cellula, l'RNA viene retrotrascritto in un doppio filamento di DNA che entra nel nucleo e si integra nel genoma della cellula ospite, esprimendo così le proteine virali (Figura 11).

Semplici retrovirus come MLV non possono attraversare la membrana nucleare, e l'infezione è ristretta a cellule in mitosi quando, cioè la membrana nucleare si dissolve.



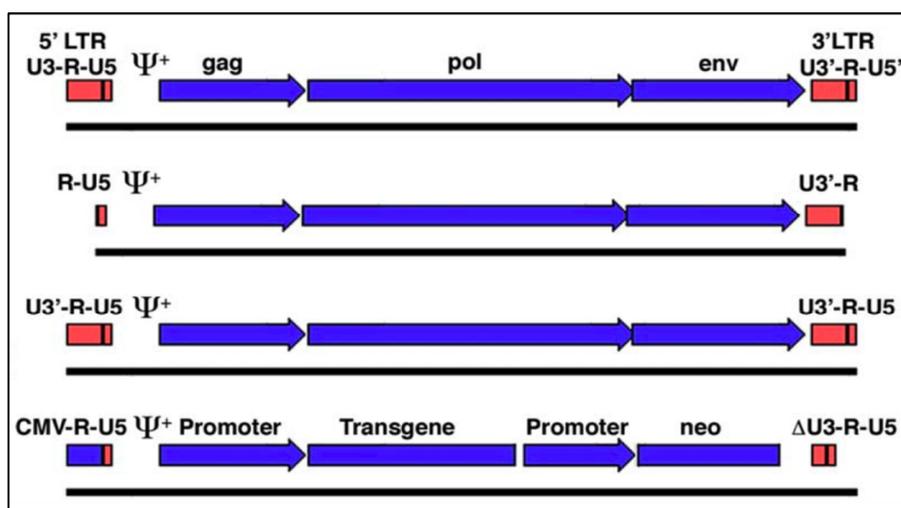
**Figura 11. Ciclo vitale del retrovirus**

I vettori retrovirali più comuni sono quelli derivati da MLV (Moloney Murine Leukaemia Virus), che è un virus anfotropico, capace cioè di infettare cellule sia umane che murine. In tali vettori, i geni virali vengono sostituiti dal transgene di interesse, che viene inserito tra le LTRs a valle del segnale di impacchettamento e del promotore (Figura 12). Possono essere aggiunti inoltre geni marcatori (come la Neomicina) e promotori alternativi di origine virale.

Le regioni codificanti gag, pol ed env vengono separate in distinte unità trascrizionali in modo da diminuire il rischio di produzione di virus wild type tramite ricombinazione, ed inserite con un'integrazione stabile in linee cellulari che prendono il nome di packaging cells. Le packaging cells sono in grado di generare un virione completo, dal punto di vista strutturale, ma vuoto poiché non contengono la sequenza  $\Psi$  e non sono in grado, quindi, di impacchettare il genoma virale nel virione. Il vettore virale invece, contiene il transgene a valle di  $\Psi$ , e quindi, se inserito in una linea packaging si produce una progenie virale, il cui virione è fornito dalla linea packaging e il "genoma" è costituito dal vettore virale

ricombinante contenente il transgene.

Il range di cellule che possono essere infettate (tropismo) dai retrovirus ricombinanti così prodotti, dipende dal tipo di proteine dell'envelope presenti sul virione, e quindi dalle packaging cells utilizzate. Si possono distinguere in retrovirus ectotropici, in grado di infettare solo cellule di roditori e retrovirus anfotropici, che infettano quasi tutte le cellule di mammifero.



**Figura 12. Rappresentazione schematica del genoma del retrovirus e del vettore retrovirale**

La scelta del sistema vettore è strettamente dipendente dalle cellule target. Generalmente, i vettori derivati da MLV sono più facili da produrre e, ad oggi, sono disponibili un'ampia gamma di packaging cells. Comunque, l'infezione da parte di questi virus risulta estremamente limitata in cellule quiescenti o a bassa velocità di crescita e quindi devono essere utilizzate solo in cellule ad elevata velocità di crescita quali cellule tumorali.

# 2

## Scopo della tesi

---

Il Medulloblastoma è una neoplasia embrionale maligna ad elevata cellularità classificato come tumore neuroectodermico che colpisce in prevalenza nella fascia d'età fra i 5-6 anni ed il 20% dei casi si verifica al di sotto dei due anni. Si tratta di una neoplasia altamente aggressiva ed invasiva che frequentemente diffonde anche oltre il sistema nervoso centrale.

Nonostante le sofisticate tecniche di chirurgia, radioterapia e chemioterapia questa neoplasia continua ad esser caratterizzata da un alto tasso di mortalità, con una sopravvivenza a 5 anni di circa il 40-80% dei casi, mentre a 10 anni decresce fino al 40-50%, tuttavia i sopravvissuti presentano gravi effetti secondari dovuti ai trattamenti molto aggressivi.

Una recente classificazione molecolare ha definito tre sottogruppi di Mb: Wnt (15%), Shh (25%) e tumori non Wnt/Shh (60%). Tutti e tre i sottogruppi vedono il coinvolgimento dell'oncogene *MYCN* in particolare è riscontrabile un'overespressione nel gruppo Shh ed un'amplificazione in una vasta percentuale del gruppo non Wnt/Shh. Ad ogni modo l'overespressione o l'amplificazione dell'oncogene rappresentano un fattore prognostico negativo, associato ad un outcome sfavorevole (*P. A. Northcott.2011, M. Remke 2011, D.W.Parsons 2011*).

Da qui la necessità di migliorare le aspettative terapeutiche, agendo sull'inibizione specifica dell'oncogene *MYCN*.

L'individuazione di *MYCN* come target terapeutico per strategie dirette ad ottenerne l'inibizione selettiva ha già dato positivi riscontri nel

neuroblastoma (*Pession et al. 2004, 2005*) ed è alla base degli scopi che si prefigge questa tesi.

Si suppone quindi che l'inibizione selettiva possa fornire un'opportunità per ridurre la proliferazione delle cellule tumorali e riattivare il normale pathway apoptotico dato il coinvolgimento di *MYCN* in questi due importanti aspetti dell'omeostasi tissutale.

A tale scopo sarà utilizzato un PNA, omologo sintetico strutturale degli acidi nucleici capace di legarsi in modo specifico a sequenze di DNA e inibire l'espressione genica mediante il blocco del processo trascrizionale (antigene).

Oggetto di questa tesi sono quindi la valutazione dell'efficacia antitumorale di un PNA anti-gene anti-*MYCN*, *in vitro* su diverse linee cellulari di Mb, e la creazione di un modello murino preclinico *xenograft* ortotopico che ricapitoli il più fedelmente possibile le condizioni cliniche della malattia e che permetta di valutare *in vivo* l'effetto antitumorale derivante dal silenziamento genico di *MYCN* tramite un oligonucleotide modificato (PNA).

Ci si propone di creare un modello ad alta incidenza e bassa latenza che attraverso la metodica di Imaging Molecolare bioluminescente ci permetta di monitorare precocemente lo sviluppo e la crescita della massa tumorale, tramite l'inoculo di cellule di Mb umano che presentano amplificazione e sovraespressione dell'oncogene *MYCN*, trasformate stabilmente con il gene della luciferasi.

Per l'allestimento del modello ortotopico murino *xenograft* di Mb saranno utilizzati topi neonati immunodepressi.

Si vogliono studiare la latenza, la progressione, l'incidenza, le caratteristiche del tumore stesso e possibili metastasi al fine di ottenere un preciso modello per futuri studi preclinici sull'efficacia di nuovi trattamenti quali il metodo di silenziamento gene-specifico sopracitato diretto contro *MYCN*.

# 3

## Materiali e Metodi

---

### 3.1 Linee cellulari

Tutti gli esperimenti fatti sono stati condotti su diverse linee cellulari di Medulloblastoma: DAOY, D341med, D425 med, D283med, D556med e D384 med,.

Le DAOY sono una linea cellulare di Medulloblastoma cerebellare desmoplastico, stabilizzata per la prima volta nel 1985 da P.F.Jacobsen al Royal Perth Hospital in Australia. Questa linea è stata ottenuta da materiale biptico estratto da un tumore cerebrale sviluppatosi a livello della fossa posteriore in un bambino di quattro anni. Sebbene il tumore originale presentasse delle caratteristiche di differenziazione sia neuronale che gliale, queste non venivano mantenute dalla linea cellulare estratta. La linea cellulare delle D341med appartenente al sottotipo classico di Mb, è stata stabilizzata nel 1988 da parte di Friedman e i suoi collaboratori. Tale linea, ottenuta da tessuto tumorale estratto da un bambino affetto da Medulloblastoma, è caratterizzata dal fatto che manifesta positività nell'esprimere proteine neurofibrillari, glutamina sintetasi e neuroni specifici enolasi, ma al contrario risulta negativa riguardo le proteine Gfap e S100. Ulteriore caratteristica di estrema importanza inerente a questa linea è rappresentata dalla dimostrazione relativa all'amplificazione dell'oncogene *MYC*.

Sebbene le linee cellulari utilizzate risultino diverse tra loro sia da un punto di vista morfologico che colturale, sono accomunate dalla medesima origine istologica, infatti sono ottenute dal sistema nervoso

centrale e più precisamente dal cervelletto. Oltre al fatto che essendo linee cellulari di natura tumorale sono in grado di dividersi in modo continuo ed illimitato.

In relazione alla eterogeneità del tumore, alcune linee cellulari si presentano adese mentre altre in sospensione. A questa ultima categoria infatti vi appartengono le D341med, le D283med, le D556med, le D384med e le d425med, linee cellulari in sospensione in cui le singole cellule di aspetto sferoidale tendono ad avvicinarsi formando aggregati, anche di dimensione piuttosto notevoli, definiti cluster. Al contrario le DAOY, si presentano come due linee cellulari di Medulloblastoma che tendono a crescere adese con una disposizione monolayer e una forma oblunga definita "neuronal like" (ovvero di forma simile a neuroni) in relazione alla loro origine nervosa (*Bigner et al 1997, Di C et al 2005, Friedman et al. 1992, Jacobsen et al 1985*).

Ulteriore caratteristica distintiva tra le linee utilizzate, è data dall'ambiente culturale, infatti ognuna di essa presenta un proprio terreno di sviluppo:

DAOY:

MEM.

10% FBS (Fetal Bovin Serum)

1% P\S (Penicillina e Streptomicina)

1% Glutammina

D341med D283med D556med D425 med D384med:

MEM

20% FBS (Fetal Bovin Serum)

1% P\S (Penicillina e Streptomicina)

1% Glutammina

Tutte le linee cellulari sono state coltivate in fiasche di polistirene T25 (Falcon) e conservate in incubatori alla temperatura di 37°C, a una percentuale di CO<sub>2</sub> pari al 5%.

Per mantenere ed amplificare le cellule adese in coltura, si sono dovute effettuare delle diluizioni procedendo togliendo il terreno dalla fiasca, lavando le cellule con PBS 1X (Sigma) al fine di rimuovere tutti i residui di terreno, in particolar modo di siero, che possono inibire l'effetto del citrato; dopo di che è stato aggiunto citrato 1X fino a coprire il fondo della fiasca, che viene incubata per 5 minuti, o comunque fino a che le cellule non si siano staccate. Il citrato viene poi neutralizzato con PBS 1X e le cellule raccolte in provette vengono centrifugate a 1100rpm per 5 minuti; mentre il sovrnatante ottenuto viene eliminato, il pellet viene diluito con terreno completo, precedentemente riscaldato a 37°C e dunque ripiastrate.

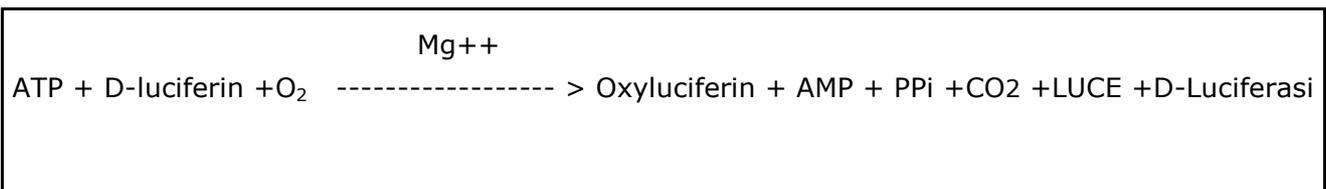
Per quanto riguarda le cellule in sospensione, D341med, D283med, D556med, D425med, D384med per amplificarle si raccolgono in una provetta e si centrifugano, anch'esse a 1100rpm per 5 minuti in modo tale da poter ottenere un pellet di cellule che verrà diluito a seconda delle necessità.

### 3.2 Valutazione della crescita cellulare con saggio ATPlite

Il Saggio ATPlite (luminescente ATP detection Assay sistem, Perchin Elmer) rappresenta un sistema di monitoraggio della crescita cellulare basato sulla luciferasi della lucciola *Photinus Pyralis*. Questa tecnica è stata utilizzata per realizzare curve di crescita di 24, 48, 72, 96, 120, 144 ore sulle linee cellulari di Medulloblastoma.

L'ATP può essere considerato un valido marker della vitalità cellulare, essendo presente in tutte le cellule metabolicamente attive e mostrando un rapido calo di concentrazione nel caso in cui le cellule vadano in contro a necrosi o apoptosi. Conseguentemente ne deriva che valutando la

presenza di ATP all'interno della cellula è possibile capire quante cellule siano vive e quante morte. Una volta aggiunto l'enzima D-luciferasi alle cellule lisate, l'ATP fuoriuscito da queste reagisce con la D-luciferina producendo una quantità di luce che è proporzionale alla concentrazione di ATP presente, e quindi in maniera indiretta, si riesce a risalire al numero di cellule presenti.



**Figura 13. Schema della reazione**

La luce prodotta viene rivelata mediante l'uso dello strumento Tecan Infinite F200.

L'inizio di tale valutazione ha luogo con la semina delle cellule (in terreno completo) fino a raggiungere un volume finale di 100µl\pozzetto. Le cellule vengono seminate su piastre P96 caratterizzate da pozzetti con fondo trasparente e bordi opachi al fine di ridurre la dispersione della luce emessa durante la reazione.

Per ogni tempo di semina sono stati piastrati almeno 5-6 pozzetti, per avere un numero di repliche statisticamente valido.

Alla fine di ogni periodo di semina la piastra è stata così trattata:

- 1) Sono stati aggiunti a tutti i pozzetti 50µl di *Mammalian Cell Lysis Solution* necessario per far fuoriuscire l'ATP dalle cellule e inattivare le ATPasi endogene. Le piastre sono poi state agitate per 5 minuti a 700rpm;
- 2) Sono stati infine aggiunti 50µl di *SUBSTRATE SOLUTION*, che permette di stabilizzare la reazione dell'ATP, e di nuovo seguirà l'agitazione delle piastre per 5 minuti a 700rpm;
- 3) La piastra viene posta al buio per 10 minuti, dopo di che avviene la rivelazione nello strumento atto a stabilire la luminescenza prodotta.

I dati ottenuti sono stati elaborati con il programma GraphPad Prism 4.0 e con Microsoft Excel.

### 3.3 Trattamento delle cellule con PNAs-NLS anti-MYCN

Il PNA (Peptide Nucleic Acid) anti-gene è stato testato su tutte le linee cellulari di Medulloblastoma. Le cellule in un primo momento sono state staccate o prelevate dalla fiasca T25, a seconda che si tratti di cellule adese o in sospensione, contate tramite colorazione *Tripin Blue*, in cui a 20µl di sospensione cellulare sono stati aggiunti 20µl di *Tripin Blue Solution* 0,4% (SIGMA). L'utilizzo del colorante *Tripin Blue* non è solo un utile strumento per poter fare una stima approssimativa del numero di cellule presenti, ma rappresenta anche un valido supporto per poter valutare la vitalità cellulare. Infatti questo colorante viene generalmente escluso dalle cellule vitali, per cui solo le cellule morte che hanno la membrana permeabile, risultano di colore blu. Le cellule vive invece si presentano chiare e di aspetto traslucido.

La mix formatasi viene caricata nella camera di Burker, che viene posta al microscopio ottico rovesciato Wilovert (Wetzlar) per consentirne la conta. Il numero totale di cellule viene calcolato utilizzando la seguente formula:

$$\text{N}^{\circ}\text{di cellule/ml} = \text{n}^{\circ}\text{di cellule medio per quadrato} \times 10^4 \times \text{fattore di diluizione}$$

Le cellule vengono seminate sulla piastra P96 (con bordi dei pozzetti opachi) almeno un giorno prima del trattamento, al fine di consentire loro di poter aderire al fondo del pozzetto, nel caso si tratti di cellule adese, o di formare cluster, nel caso di cellule in sospensione.

È importante sottolineare che affinché il trattamento con il PNA abbia successo, è necessario che la semina delle cellule avvenga in un terreno privo di siero. Questo è compatibile con il fatto che la presenza di siero impedisce l'entrata del PNA all'interno delle cellule.

Il giorno seguente ad alcuni pozzetti viene aggiunto una concentrazione di  $10\mu\text{M}$  di PNA anti-gene senso-NLS (PNAs-NLS). Altri pozzetti di cellule sottoposte allo stesso procedimento, non verranno trattate con il PNA, con lo scopo che possano fungere da controllo negativo. Contemporaneamente a queste, alcuni pozzetti verranno usati per il trattamento con il PNA anti-gene mutato (PNAmt-NLS).

Le cellule così trattate verranno poste in incubatore per 6 ore, tempo che si ritiene necessario affinché il PNA possa penetrare nelle cellule. Al termine di questo periodo ad ogni pozzetto viene aggiunto FBS ad una concentrazione corrispondente al fabbisogno della linea cellulare, dopo di che le cellule vengono riposte nuovamente nell'incubatore.

Secondo queste modalità sono stati eseguiti due tipi di esperimento:

- 1- le cellule sono state trattate per 24, 48, 72, 96, 120, 144 ore al fine di valutare la crescita mediante il saggio ATPlite;
- 2- le cellule sono state trattate per 12 ore per poi estrarne l'RNA.

### 3.4 Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione mediante RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto dalle linee cellulari di Medulloblastoma non trattate e trattate con PNAs-NLS e con PNAmt-NLS, dopo un tempo di 12 ore di trattamento, da un numero di cellule compreso tra  $50-100 \times 10^3$ . L'estrazione dell'RNA è stata effettuata utilizzando il kit RNeasy Mini Kit della Qiagen (Santa Clarita, CA). Le cellule sono state raccolte e centrifugate una prima volta nel terreno a 1100 x rpm, poi dopo un lavaggio in PBS 1X, centrifugate nuovamente alla medesima velocità, allo scopo di eliminare qualsiasi residuo di terreno che potrebbe ridurre l'efficienza dell'estrazione. A questo punto il pellet ottenuto è stato risospeso in 350 $\mu\text{l}$  di soluzione lisante (Buffer RLT). Il lisato di cellule viene omogeneizzato aspirandolo per 20 volte con una siringa munita di ago 20G (0,9 mm di diametro) dopo di che ad esso è stato aggiunto un volume di 350 $\mu\text{l}$  di etanolo al 70% per far precipitare gli acidi nucleici appena liberati. Successivamente i 700 $\mu\text{l}$  di campione sono stati trasferiti

in una colonnina (RNasy mini column) posta in un collection tube e centrifugati per 15 secondi a 10000 x rpm, affinché l'RNA venga adsorbito dalla membrana. Sono stati aggiunti 350µl di Buffer RW1 e centrifugati per 15 secondi a 10000 x rpm. Al fine di rimuovere completamente il DNA è stata aggiunta direttamente sulla membrana una mix costituita da 1µl di DNasi I, 5µl di Buffer RDD e portata ad un volume di 50 µl con RNeasy-Free water. La colonnina con all'interno la mix è stata lasciata a temperatura ambiente per 15 minuti. Quindi alla colonnina sono stati aggiunti 350µl di Buffer RW1 e centrifugati per 15 secondi a 10000 x rpm. La colonnina è stata trasferita in un nuovo collection tube da 2 ml, sono stati aggiunti 500µl di Buffer RPE (addizionato di etanolo) e sono stati centrifugati per 15 secondi a 10000 x rpm. È stato fatto un ulteriore lavaggio con Buffer RPE ed è stato centrifugato per 2 minuti a 10000 x rpm. Infine per consentire alla membrana di asciugarsi, il tutto viene fatto centrifugare per 1 minuto alla massima velocità. La colonnina è stata trasferita in nuovo collection tube da 1,5ml e l'RNA è stato eluito mediante l'aggiunta di 30\50µl di RNeasy-Free water direttamente sulla membrana e centrifugato per 1 minuto a 10000 x rpm.

L'RNA totale recuperato da ciascun campione è stato quantificato tramite lettura allo spettrofotometro Nanodrop ND-1000 (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE) presso il dipartimento di Biochimica, ad una lunghezza d'onda di 260nm.

L'RNA ottenuto è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando la retrotrascrittasi inversa "SuperScript™ II" (Invitrogen™). La reazione di retrotrascrizione prevede la preparazione di una prima mix contenente, per ogni campione, 1µl di dNTPs 10mM, 1µl di Oligo dT 500µg/ml, 500ng-1 µg di RNA totale e acqua sterile fino a raggiungere un volume di 12µl. Tale mix è stata posta nel termociclatore (PTC 225; Mj research, Watertown, MA) a 65°C per 5 minuti (al fine di denaturare l'RNA e gli Oligo dT) e poi a 4°C per 1 minuto. A questo primo step, definito STEP 2RT, ne segue un secondo, STEP 4RT, in cui viene aggiunta una seconda mix, costituita da 2µl di Buffer 5X, 4µl di MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2µl di DTT 0,1M e 1µl di RNeasy Out

40U/μl. Il tutto viene posto nel termociclatore a 42°C per 2 minuti. Successivamente alla miscela di reazione è stato aggiunto 1μl di SuperScript II (50U/μl), STEP 6RT, e la retrotrascrizione è stata effettuata con il seguente programma:

42°C per 50 minuti, 70°C per 15 minuti e 4°C fino allo step successivo.

I campioni ottenuti vengono poi conservati ad una temperatura di -20°C.

### 3.5 Progettazione primers

La scelta delle sequenze è stata effettuata con l'ausilio dei programmi (per elaboratore Macintosh) Amplify 1.2 ed Oligo 6.6.

Il programma Oligo 6.6 è in grado di leggere una sequenza di DNA e di progettare su di essa i primers senso e antisenso. Tali sequenze vengono successivamente analizzate con il programma Amplify 1.2, che mostra il match tra i primer ed il DNA, la lunghezza del trascritto risultante e la presenza di eventuali dimeri di primers o bande aspecifiche.

Per ogni coppia di primers è stato verificato che non ci fossero regioni di autocomplementarietà, o di complementarietà reciproca, e che la temperatura di Melting (T<sub>m</sub>) dei 2 primers fosse simile. Tramite i programmi del gruppo Blast (Basic Local Alignment Search Tool, [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast)), si è verificato che le sequenze identificate tra tutte quelle note e conservati nella banca dati UCISC, fossero specifiche per il gene studiato e non si appaiassero in altri punti del genoma. Con il programma ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)) è invece stato controllato che i primers fossero specifici per l'organismo (Homo Sapiens o Mus Musculus, a seconda dei casi).

### 3.6 PCR qualitativa

Per la reazione di PCR del cDNA di *MYCN* è stata utilizzata una coppia di primer progettata in base alla sequenza di questo gene depositata in EMBL come HSNMYC01 1-6788bp. I due primer sono stati progettati utilizzando i software Primer e Amplify. La specificità delle sequenze è stata valutata utilizzando il programma di omologia BLAST. Le sequenze dei due primers sono:

Primer senso: 5'- CGA CCA CAA GGC CCT CAG T-3'

Primer antisenso: 5'- TGA CCA CGT CGA TTT CTT CCT-3'

Essi hanno  $T_m$ , rispettivamente, di 61°C e 59,1°C.

La miscela di reazione PCR è costituita da Buffer 1X (Eppendorf), dNTP 0,2mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, 0,2μM di ciascun primer, 1U di Taq DNA polimerasi (Eppendorf) e 500ng-1μg di cDNA, in un volume finale di 25μl.

Le condizioni di PCR che sono state utilizzate sono le seguenti:

- denaturazione preliminare a 96°C per 1 minuto;
- 40 cicli di: denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 60°C per 1 minuto, estensione a 72°C per 1 minuto;
- passaggio a 75°C per 6 minuti;
- permanenza finale a 4°C.

La reazione di PCR è stata effettuata in un termociclatore PTC-225.

8μl dei prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%, con 0,5μg/ml di bromuro di etidio, in un buffer 0,5X TBE. Insieme ai campioni è stato fatto correre su gel anche un marcatore di peso molecolare marker XIV (Roche). Le bande ottenute sono state fotografate.

### 3.7 Reazione di PCR quantitativa Real-Time

La PCR quantitativa Real-Time (qPCR) è stata realizzata utilizzando la metodica SYBR Green. Questo saggio di quantificazione è basato sull'incremento di fluorescenza provocato dal legame della molecola SYBR Green al solco minore del DNA. È stata eseguita una qPCR relativa, in cui la quantità di cDNA di *MYCN* è stata rapportata a quella del cDNA della  $\beta$ -actina, GAPDH e ATPs, che sono usati come geni di controllo endogeno. A questo scopo sono state utilizzate le seguenti coppie di primer:

*MYCN* senso (300nM): 5'- CGA CCA CAA GGC CCT CAG T -3'

*MYCN* antisenso (300nM): 5'- TGA CCA CGT CGA TTT CTT CCT -3'

$\beta$ -actina senso (300nM): 5'- TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A -3'

$\beta$ -actina antisenso(300nM):5'- CAG CGG AAG CGC TCA TTG CCA ATG G-3'

GAPDH senso (300nM): 5'- CCA ATA TGA TTC CAC CCA TGG C -3'

GADPH antisenso (300nM): 5'- CTT GAT TTT GGA GGG ATC TCGC -3'

ATPs senso (300nM): 5'- GTC TTC ACA GGT CAT ATG GGG A -3'

ATPs antisenso (300nM): 5'- ATG GGT CCC ACC ATA TAG AAG G -3'

La miscela di reazione per l'amplificazione di *MYCN* è costituita da SYBR Green Master Mix 1X (Applied BioSystem), primer senso ed antisenso alle opportune concentrazioni e 10ng di cDNA. Similmente viene preparata la miscela di reazione per l'amplificazione della  $\beta$ -actina, della ATPs e di GAPDH. In entrambe le reazioni il volume finale è 20 $\mu$ l.

Le condizioni di PCR sono:

50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti e 50 cicli costituiti da 95°C per 15secondi e 60°C per un minuto con uno step finale di 20 minuti con temperatura da 60°C a 95°C.

La reazione è stata realizzata utilizzando il GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied BioSystem).

### 3.8 Western Blot

Il Western Blot è un particolare procedimento teso ad evidenziare la presenza di una determinata proteina all'interno di una miscela di queste. Si incomincia estraendo le proteine dalle cellule in coltura vengono raccolte e lisate con una soluzione generalmente 200µl per  $5 \times 10^6$  cellule. Tale soluzione è composta da  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M a pH 7.5, Igepal 1%,  $\beta$ -glicerolfosfato 0.1mM e Complete 2X (Roche). Una volta ottenuto il sovrantante, nel quale sono presenti le proteine, questo può essere congelato a  $-80^\circ\text{C}$  in piccoli volumi (10-15µl).

I campioni ottenuti, prima di essere caricati sul gel vengono quantificati, mediante metodo di Lowry, allo spettrofotometro a 660nm al fine di determinare la concentrazione delle proteine presenti.

A questo punto quantificata la concentrazione di proteine presenti nei campioni, questi vengono caricati su un gel di poliacrilamide al 10% per effettuare una corsa elettroforetica, che consenta alle proteine presenti di separarsi secondo i propri pesi molecolari.

Terminata la corsa si procede al trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana in PVDF utilizzando il sistema con procedura per trasferimento umido.

Successivamente al trasferimento si procede con il Blocking, passaggio necessario per saturare la membrana e ridurre l'eventuale evidenziazione di aspecifici durante la fase di lettura. A questo punto si passa all'incubazione, dapprima con anticorpo I° (1:200) e dopo con anticorpo II° (1:1000) utilizzando una soluzione di ECL (Amersham Bioscience). Infine i dati ottenuti sono stati analizzati col programma Quantity One.

### 3.9 Saggio di morte cellulare

Per effettuare il saggio di morte cellulare è stato usato il kit: (*APO-BrdU<sup>TM</sup> TUNEL Assay Kit*) seguito da rilevazione delle cellule apoptotiche al microscopio a fluorescenza.

La tecnica chiamata TUNEL consente di investigare la presenza di frammenti (di circa 200 paia di basi) che derivano dalla degradazione del DNA, in seguito all'attivazione di nucleasi, come risposta agli eventi e/o alle sostanze che inducono una cellula ad indirizzarsi verso il processo apoptotico (in questo caso, la presenza di PNA). Grazie a tale tecnica è possibile rilevare i frammenti di DNA a causa dell'elevata presenza di regioni 3'-idrossi, le quali fungono da punti di inizio per l'enzima Terminal Deossinucleotidil Transferasi (TdT), la quale aggiunge deossiribonucleotidi che saranno rilevabili in quanto contrassegnati dalla Bromodeossiuridina incorporata.

### 3.10 Sistema di espressione retrovirale

#### 3.10.1 Espressione stabile della luciferasi con sistema retrovirale

La metodica prevede i seguenti passaggi:

1. Trasformazione batterica, per l'amplificazione del vettore retrovirale ricombinante codificante il gene della luciferasi ed estrazione del DNA plasmidico;
2. Trasfezione delle packaging cells (Phoenix) con vettore plasmidico, per ottenere retrovirus ricombinanti;
3. Infezione di linee cellulare di medulloblastoma (DAOY, D341, D556)
4. Selezione e amplificazione delle linee DAOY, D341, D556, -LUC
5. Saggi di espressione della luciferasi nelle linee selezionate.



è la geneticina (G418), mentre per la selezione in batteri si utilizza ampicillina. L'espressione del gene della geneticina permette la selezione clonale in cellule di mammifero mediante antibiotico resistenza.

### 3.10.2 Trasformazione batterica ed estrazione del DNA plasmidico

La trasformazione batterica è effettuata in *E. Coli competent cells* ceppo XL1(Stratagene).

L'inserzione del DNA plasmidico, 1mg totale, nei batteri avviene per shock termico (42°C per 30 secondi). I batteri sono poi incubati overnight a 37°C in terreno di selezione LB (estratto di lievito, NaCl, H<sub>2</sub>O) con ampicillina alla concentrazione di 1mg/ml. Al termine dell'incubazione il DNA plasmidico è estratto e purificato con kit QIAfilterPlasmid Maxi Kit (QIAGEN).

Il DNA plasmidico estratto dalla coltura batterica viene quantificato tramite spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington,DE).

### 3.10.3 Trasfezione delle packaging cells (Phoenix) con vettore retro virale

La linea cellulare Phoenix (Phoenix Retroviral Expression System, Orbigen) deriva dalla linea cellulare 293T (linea cellulare ottenuta trasformando cellule embrionali di rene con adenovirus E1a). Le Phoenix sono coltivate in adesione in terreno DMEM (Cambrex) con l'aggiunta di 10% FBS (GIBCO), 1% di L-glutamina (Euroclone), 1% di antibiotici streptomicina/penicillina.

Le cellule vengono staccate dalla fiasca con tripsina 1X per circa 30 secondi. Al termine la tripsina viene neutralizzata con terreno completo e

le cellule sono centrifugate a 1100rpm per 5'. Il pellet è lavato una volta con PBS e risospeso in terreno completo.

Le cellule vengono dispensate in piastra da 6 pozzetti alla concentrazione di  $1 \times 10^5$  cell/ml in 3 ml di terreno completo. Dopo 24 ore si procede alla trasfezione delle cellule con il DNA plasmidico mediante lipofectamina (Invitrogen).

Il protocollo prevede la preparazione di una soluzione di trasfezione secondo le seguenti modalità:

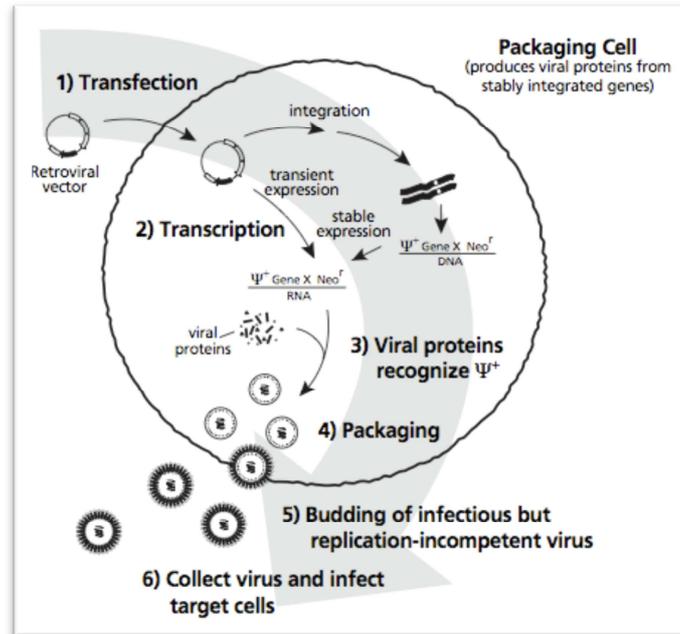
MIX1 DNA plasmidico (30mg totali) + DMEM fino al volume finale di 900  $\mu$ l

MIX2 60ml di lipofectamina + 840  $\mu$ l di DMEM

Nelle MIX non è contenuto siero in quanto questo interferisce con l'azione della lipofectamina. Le due MIX sono risospese e unite in un'unica soluzione di trasfezione. Si lascia incubare 30 minuti a temperatura ambiente per permettere la formazione dei complessi DNA-lipofectamina. In ogni pozzetto si dispensano 300  $\mu$ l di soluzione di trasfezione e 700  $\mu$ l di DMEM e si lascia incubare 5-6 ore a 37°C.

Al termine dell'incubazione si aggiunge 1 ml di DMEM con il 20% di FBS in modo da ripristinare la concentrazione di siero ottimale per la crescita cellulare.

Dopo 24 ore il terreno di trasfezione viene sostituito con 1 ml di terreno completo e la piastra viene nuovamente incubata a 37°C per 24 ore per consentire la produzione del retrovirus che viene rilasciato nel supernatante. Trascorse le 24 ore di incubazione, il supernatante contenente lo stock retrovirale, che per convenzione chiameremo P1, viene prelevato e sostituito con 1 ml di terreno completo. Le Phoenix vengono incubate nuovamente per 24 ore, per consentire la produzione del secondo stock virale P2. Gli stock virali vengono filtrati con filtro 0.45 $\mu$ m (Millipore) in modo da eliminare residui cellulari presenti nel supernatante ed utilizzati per l'infezione delle cellule.



**Fig.16 Infezione della linea cellulare di medulloblastoma.**

Per permettere un'elevata efficienza di trasformazione le cellule devono essere in fase esponenziale di crescita. Per aumentare l'efficienza di penetrazione del virus all'interno delle cellule, si utilizza Polybrene (Millipore), un polimero cationico che neutralizza la repulsione di carica tra i virioni e l'acido sialico presente sulla superficie cellulare, alla concentrazione di 8 mg/ml.

Per l'infezione,  $2 \times 10^5$  di DAOY e  $1 \times 10^6$  D341, D556 vengono ricoperte da 5 ml di stock retrovirale. Per convenzione chiameremo le cellule infettate con lo stock virale P1, DAOY-/D341-/D556-LUC1, mentre le cellule infettate con P2, ,DAOY-/D341-/D556-LUC2. Le cellule vengono in seguito incubate a 37°C per circa 48-72 ore nel caso delle cellule adese DAOY mentre nel caso delle cellule in sospensione D341 e D556 si procederà alla *spinoculation*, metodica utilizzata per aumentare l'efficienza di infezione in cellule in sospensione. La *spinoculation* prevede la centrifuga della miscela di infezione per circa 2 h a 3000 rpm a 37°C. Al termine della *spinoculation*, le cellule sono state risospese in terreno completo, ed incubate a 37°C per circa 48-72 h.

### 3.10.4 Selezione ed amplificazione delle linee DAOY-D341 e D556.

Dopo 48 ore dall'infezione le cellule vengono sottoposte a selezione in terreno completo con aggiunta di geneticina alla concentrazione di 1 mg/ml. La resistenza all'antibiotico è conferita dall'espressione del gene Neo posto, nel vettore retrovirale, a valle del gene della luciferasi. Solo dunque le cellule che hanno correttamente integrato la sequenza retrovirale e che esprimono tali geni cresceranno in presenza dell'antibiotico. La selezione procede per circa 10 giorni durante i quali il terreno di coltura viene sostituito frequentemente in modo da eliminare dalla sospensione cellulare le cellule in cui l'infezione è stata inefficace e che dunque non sopravvivono alla selezione.

### 3.10.5 Saggi di valutazione della bioluminescenza *in vitro*

Al termine della selezione vengono eseguiti i seguenti saggi:

- saggio della luciferasi, per verificare l'espressione e la funzionalità dell'enzima;
- analisi dello spettro d'emissione della luciferasi in cellule intere;
- valutazione della proporzionalità del segnale/cellule.

#### Saggio della luciferasi

Il saggio permette di verificare l'espressione e la funzionalità dell'enzima luciferasi in presenza del substrato D-luciferina, mediante rilevazione della luminescenza. A tale scopo viene utilizzato il kit di rilevazione Steady-Glo<sup>®</sup> Luciferasi Assay System (Promega).

In una piastra da 96 pozzetti vengono dispensate  $1 \times 10^4$  cellule per ogni popolazione clonale selezionata e  $1 \times 10^4$  cellule di controllo non trasformate. In ogni pozzetto vengono aggiunti 100ml di soluzione del kit.

Dopo 5 minuti di incubazione al buio, si esegue la lettura della luminescenza allo strumento Infinite F200 (TECAN).

### Analisi dello spettro d'emissione della luciferasi in cellule di medulloblastoma

Al fine di selezionare cloni cellulari esprimenti stabilmente la luciferasi WT di *Photinus pyralis* è stata effettuata un'analisi al luminometro (Varioskan flash) dei segnali luminosi prodotti dopo aggiunta di D-luciferina (Promega). In particolare sono state seminate  $10^5$  cellule DAOY-/D341-/D556-Luc in 100  $\mu$ l di PBS per pozzetto ed è stato analizzato lo spettro di emissione della luciferasi alle varie lunghezze d'onda in cellule intere dopo 1 minuto dall'aggiunta del substrato. Le misure di luminescenza sono state effettuate a 25°C. Per la scelta del clone cellulare da utilizzare negli esperimenti *in vivo* è stato comparato il valore di luminescenza (espresso in RLU) al massimo di emissione della luciferasi (560nm).

### Validazione *in vitro* della bioluminescenza

Al fine di validare l'utilizzo di cellule DAOY-/D341-/D556-Luc nella messa a punto di un modello animale di progressione tumorale per il medulloblastoma è stata effettuata una misura al luminografo (LB 981, Berthold technologies) dell'intensità del segnale bioluminescente in relazione al numero delle cellule vive intere previa conta con Trypan blu del numero effettivo di cellule vive.

### 3.11 Allevamento di topi NOD/SCID

L'impiego degli animali utilizzati in questo lavoro segue le disposizioni del Decreto Legislativo n°116 del 27/01/1992.

Gli animali utilizzati sono topi (*mus musculus*) NOD/SCID (*severe combined immunodeficiency disease*). Questo ceppo transgenico è stato ottenuto incrociando il ceppo NOD, che porta la mutazione *Prkdc<sup>scid</sup>* in emizigosi. Ne deriva un ceppo completamente privo di cellule T e B funzionali e di immunoglobuline e, quindi incapaci di elaborare una risposta immunitaria cellulo-mediata. Queste caratteristiche fanno sì che i topi SCID siano gli animali ideali per modelli *xenograft*, dove una risposta immunitaria porterebbe al rigetto delle cellule impiantate.

E' stata allestita una colonia di topi SCID (Charles River) tramite l'incrocio di topi SCID. Questi animali, a causa della grave immunodeficienza, devono essere stabulati in ambienti sterili in modo da prevenire il contatto con qualsiasi agente patogeno. L'ambiente di stabulazione è costituito da una stanza dotata di un impianto di regolazione automatica della temperatura, umidità e luce.

Condizioni di stabulazione:

- Temperatura: 20-24°C
- Umidità relativa: 50-60%
- Ricambi d'aria ogni 15 ore
- Fotoperiodo: 14 ore di luce-10 ore di buio

Gli animali, mantenuti in gabbie chiuse con filtro (Tecniplast) con lettiera sterile (Mucedola), sono stati alimentati con mangime sterile irradiato (Mucedola) ed acqua sterile *ad libitum*.

A fini riproduttivi i topi possono essere allevati in monogamia o in poligamia (*Harem*). Dopo l'accoppiamento, la gravidanza è stata verificata con l'aumento di peso della femmina, che è stata quindi separata dal maschio e stabulata singolarmente, per evitare interferenze da parte del maschio. Alla femmina è stato fornito del cotone per permettere la preparazione del nido. La gestazione in genere dura 19-21 giorni, al termine dei quali viene generata una progenie mediamente di 4-9 cuccioli. Tale progenie è utilizzata a fini sperimentali.

### 3.12 Allestimento del modello murino ortotopico xenograft

Per l'inoculo si utilizzano le linee cellulari DAOY-/D341-/D556-LUC, esperimenti in modo stabile il gene della luciferasi.

Tutte le procedure descritte sono state preventivamente autorizzate dal Comitato Etico Scientifico dell'Università di Bologna Prot.n° 27182-X/6 del 1/6/2006.

#### Preparazione delle cellule

Per l'inoculo vengono scelte colture cellulari, in fase esponenziale di crescita. In questa fase e duplicano con elevata velocità di crescita.

Le cellule adese vengono prelevate dalla fiasca e centrifugate a 1100 rpm per 5'. Il pellet, contenente le cellule, viene risospeso in 1ml di PBS 1X. Da questa sospensione si preleva un'aliquota utile per la conta cellulare vitale con *Tripan-Blue* in rapporto 1:2. Una volta effettuata la conta vengono prelevate  $2.5 \times 10^5$  cellule per ciascun topo da inoculare e risospese in 10 $\mu$ l di soluzione fisiologica previo lavaggio in 200 $\mu$ l di PBS.

La sospensione così preparata è conservata in ghiaccio, fino al momento dell'inoculo.

#### Inoculo intracerebellare

L'inoculo viene eseguito in topi SCID di 3-4 giorni di vita.

Il topo è prelevato dalla gabbia e posto in ambiente sterile. Al momento dell'inoculo l'animale, posto in ghiaccio in posizione prona, subisce un'inezione all'altezza dell'emisfero cerebellare destro a ca. 2mm di profondità.

Le cellule, preparate come descritto nel paragrafo precedente, sono portate a temperatura ambiente e risospese bene. Si prelevano 10 $\mu$ l di

sospensione, contenente il numero di cellule desiderato e l'inoculo è effettuato con una siringa da 1 ml con ago 30ga.

Dopo l'inoculo il topo è riposto in gabbia e riportato alle normali condizioni di stabulazione.

### 3.13 Saggi di bioluminescenza *in vivo*

#### 3.13.1 Cinetica del segnale di bioluminescenza *in vivo*

La determinazione della cinetica del segnale di bioluminescenza è effettuata per valutare la variazione di emissione del segnale luminoso in funzione del tempo trascorso, dopo iniezione intraperitoneo di D-luciferina. I fattori principali che condizionano l'emissione del segnale delle cellule tumorali trasformate *in vivo* sono tre, il sito di inoculo, l'apporto di O<sub>2</sub> al sito e la biodistribuzione della D-luciferina nei vari organi e tessuti. I primi due fattori sono mantenuti costanti all'interno del modello sperimentale, in quanto l'inoculo è effettuato sempre nella medesima sede anatomica. Per questo motivo il principale fattore di condizionamento è dato dalla biodistribuzione del substrato. E' necessario così conoscere il tempo impiegato dalla D-luciferina a raggiungere la sede di sviluppo tumorale, in questo caso la ghiandola surrenale. A tal fine sono state effettuate acquisizioni successive di 1 minuto, ad intervalli di 30 secondi, per 15 minuti, dopo somministrazione i.p. del substrato. Le acquisizioni sono effettuate con **BertholdNightOwl**.

Questa analisi è servita per individuare la finestra temporale in cui il segnale si mantiene stabile. Tale finestra è utilizzata per le successive acquisizioni.

### 3.13.2 Valutazione della crescita tumorale con bioluminescenza

La valutazione dello sviluppo tumorale con Imaging Molecolare bioluminescente è stato effettuato a partire da una settimana dall'inoculo. L'animale viene sedato per permettere una lettura più corretta del segnale. La sedazione è effettuata mediante l'utilizzo di Zoletil(tiletamina/zolazepam) alla concentrazione di 0.5 mg/Kg in associazione con Atropina solfato (0.5 mg/Kg) per evitare l'eccesso di scialorrea ed eventuali rischi di shock vagale. Al topo viene somministrata via intraperitoneo D-luciferina alla concentrazione di 150 mg/kg in modo tale che la concentrazione del substrato non sia limitante per la reazione. L'animale viene immobilizzato e posto all'interno dello strumento per la lettura della bioluminescenza. Per l'acquisizione si utilizza **BertholdNightOwl** che permette la lettura bidimensionale della BLI. L'acquisizione è effettuata per un intervallo temporale di 3 minuti dopo 8 minuti dalla somministrazione della D-luciferina in posizione prona. L'andamento della malattia è stato monitorato mediante l'analisi delle quantificazioni effettuate ogni 7 giorni fino ad un end point in cui gli animali sofferenti vengono sacrificati. L'incremento del segnale luminoso, relativo alla crescita e allo sviluppo del tumore ha permesso di tracciare delle curve di crescita per tale modello ortotopico *xenograft*.

### 3.14 Trattamento con farmaci Chemioterapici

I modelli murini *xenograft* ortotopici descritti nei paragrafi precedenti, sono stati trattati con farmaci chemioterapici.

Per il trattamento si è seguito un protocollo clinico per medulloblastoma ad alto rischio.

Un gruppo di cinque animali appartenenti al modello *xenograft* desmoplastico (ottenuto dall'inoculo delle cellule DAOY) sono stati trattati via intraperitoneale (i.p.) seguendo un protocollo settimanale così

articolato: vincristina (VCR) 0.48 mg/kg, carboplatino (CBDCA) 60 mg/kg, etoposide (VP-16) 70 mg/kg, cyclophosphamide (CPA) 500 mg/kg. Il ciclo settimanale è stato il seguente: VCR più CBDCA al giorno uno, VP-16 al giorno tre, CPA al giorno cinque (*Vassal, Boland et al. 1997; Houghton, Morton et al. 2007; White and Sterling-Levis 2008*).

Si è altresì utilizzato un gruppo di altrettanti animali come controllo, trattati con soluzione fisiologica.

### 3.15 Trattamento *in vivo* con il PNA-NLS anti-MYCN

Il PNA (*Peptide Nucleic Acid*) anti-gene è stato testato su un gruppo di tre animali confrontati con due gruppi composti da altrettanti animali e trattati con PNAmut un gruppo e soluzione fisiologica l'altro gruppo.

Il trattamento è stato effettuato tramite l'impianto di una pompa osmotica a diffusione continua (Alzet pump). Il sistema di delivery è stato impiantato sotto cute nell'animale e cateterizzato affinché il rilascio avvenisse direttamente a livello intratumorale, per cui nell'emisfero cerebellare destro.

Per effettuare tale impianto, la pompa osmotica viene preparata ventiquattrore prima, caricando la quantità di farmaco che si desidera somministrare ed installando il catetere in modo tale da poterne verificare il corretto funzionamento e da permetterne l'immediato rilascio dopo l'impianto nell'animale.

Il trattamento ha avuto inizio al cinquantesimo giorno dall'inoculo, in una fase di crescita tumorale esponenziale per una durata complessiva di ventitré giorni (*Sylvian Bauer and Paul H. Patterson 2006;Gondi CS, Lakka SS,et al.2004*).

### 3.16 Autopsia

Gli animali che mostravano segni di sofferenza dovuti alla presenza del tumore venivano sacrificati mediante inalazione di etere dietilico. In seguito al decesso si procedeva all'autopsia secondo la seguente modalità:

- all'animale , in posizione prona, viene praticata un'incisione lungo la linea mediana che va dal collo al muso, con forbici,
- è stato aperto il cranio, prelevato l'intero cervello e processato per l'esame istologico.

### 3.17 Istologia

I campioni raccolti sono posti in appositi recipienti contenenti Formalina tamponata al 10% e conservati a temperatura ambiente per 48 ore. Al termine i campioni sono lavati con acqua fredda corrente per 30' circa e successivamente posti in etanolo al 70%, sezionati in cassette d'inclusione, dove si conservano fino alla processazione.

#### Processazione

La processazione del campione prevede diversi passaggi: disidratazione, fissazione, chiarificazione e diafanizzazione. La **disidratazione** si effettua con passaggi successivi in alcool a concentrazioni crescenti (70%, 90%), in modo tale da disidratare il campione gradualmente. Questi passaggi vengono effettuati al microonde (Milestone) che utilizza programmi specifici a diverse temperature. Il programma utilizzato prevede un passaggio a 40°C per 10min e successivamente a 50°C per 10min, da ripetere ad ogni concentrazione di alcol utilizzata. Al termine si **fissano** i campioni eliminando l'etanolo al 90% e ponendoli in etanolo al 100%. Si

ripete nuovamente lo *step* al microonde. Si esegue la **chiarificazione e diafanizzazione** passando i campioni in toluolo e *ripetendo i passaggi al microonde*.

Al termine i campioni sono pronti per l'inclusione in paraffina.

#### Inclusione in paraffina

Si procede sgocciolando le griglie dal toluolo in modo tale che non restino residui. Si immergono poi in paraffina liquida a 60°C per almeno 2 ore. Al termine si includono i pezzi con l'ausilio di formelle metalliche. Le formelle sono riempite con paraffina liquida. I campioni sono tolti dalle griglie e trasferiti nelle formelle e fissati in fondo a queste tenendo le formelle sulla piastra refrigerante per qualche secondo. A questo punto si adagia la griglia in plastica sulla formella contenente i campioni, si aggiunge ancora paraffina liquida e si lascia sulla piastra refrigerante finché la paraffina non è completamente solidificata. Infine si stacca la formella ed il campione è pronto per il taglio al microtomo.

I campioni inclusi in paraffina si conservano a temperatura ambiente a tempo indeterminato. Prima del taglio al microtomo è necessario raffreddare il campione.

#### Preparazione delle fettine di tessuto al microtomo

Le fettine vengono preparate con taglio al microtomo. Questo strumento permette la preparazione di fettine di spessore variabile. Le fettine di tessuto, utilizzate per la colorazione ematossilina-eosina hanno uno spessore di 4-5µm.

#### Colorazione dei vetrini con ematossilina-eosina

I vetrini con le fettine di tessuto sono asciugati in stufa a 60°C per 2 ore circa o a temperatura ambiente per 48 ore.

La colorazione, eseguibile solo su vetrini completamente asciutti, prevede i seguenti passaggi a temperatura ambiente:

- due passaggi in Toluolo per 3min, per eliminare la paraffina;
- due passaggi in Etanolo al 100% per 3 min;
- un passaggio in Etanolo al 95% per 3 min;
- un passaggio in Etanolo al 70% per 3 min;
- un passaggio in acqua distillata per 3 min;
- 30-60secondi in ematossilina;
- lavaggio di 10min sotto acqua corrente;
- un passaggio in Eosina per 5min;
- un rapido passaggio in acqua distillata;
- un passaggio di 30sec in etanolo al 70%;
- un passaggio di 30sec in etanolo al 95%;
- due passaggi in Etanolo al 100%;
- due passaggi in Toluolo.

Si prosegue montando il vetrino copri-oggetto su ogni fettina di tessuto, utilizzando un montante oleoso. Mentre viene fatta questa operazione, i vetrini che aspettano di essere montati sono mantenuti in Toluolo.

# 4

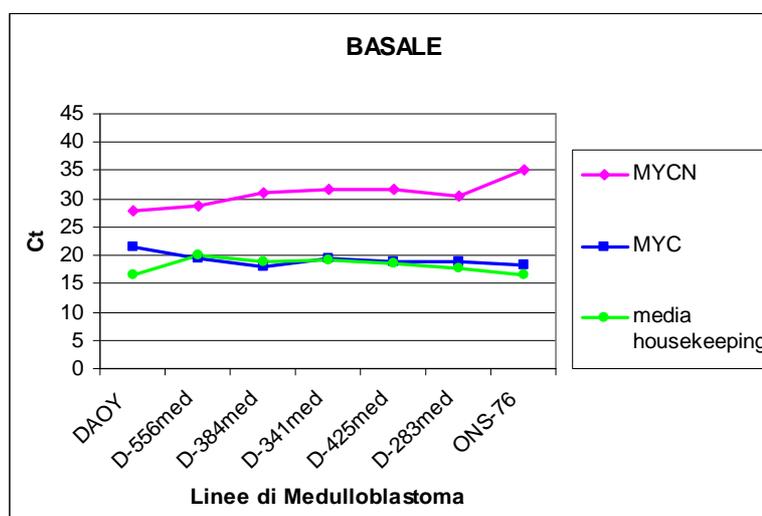
## Risultati

### 4.1 Valutazione dell'espressione dell'oncogene *MYCN*

#### 4.1.1 Quantificazione dei livelli di espressione genica di *MYCN* nelle linee di Medulloblastoma

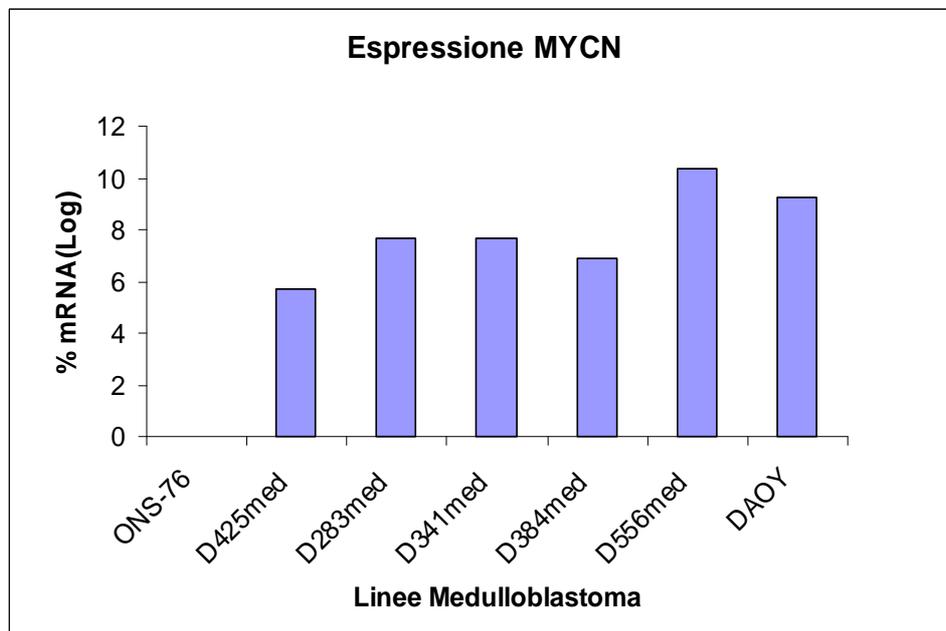
Per quantificare l'espressione genica dell'oncogene *MYCN* nelle linee cellulari di Medulloblastoma è stata utilizzata l'analisi quantitativa PCR Real-Time (qPCR). L'analisi è stata realizzata normalizzando la media dei Ct di *MYCN* sulla media dei Ct dei geni *housekeeping*: ATP sintasi,  $\beta$ -actina e GAPDH, utilizzati come controlli endogeni perché normalmente espressi in maniera quasi costante in tutte le cellule dell'organismo.

I dati sono stati ottenuti confrontando l'espressione basale del gene *MYCN* e *MYC* nelle linee cellulari di Medulloblastoma utilizzate.



**Grafico 1. Ct delle linee cellulari di Medulloblastoma usate negli esperimenti.**

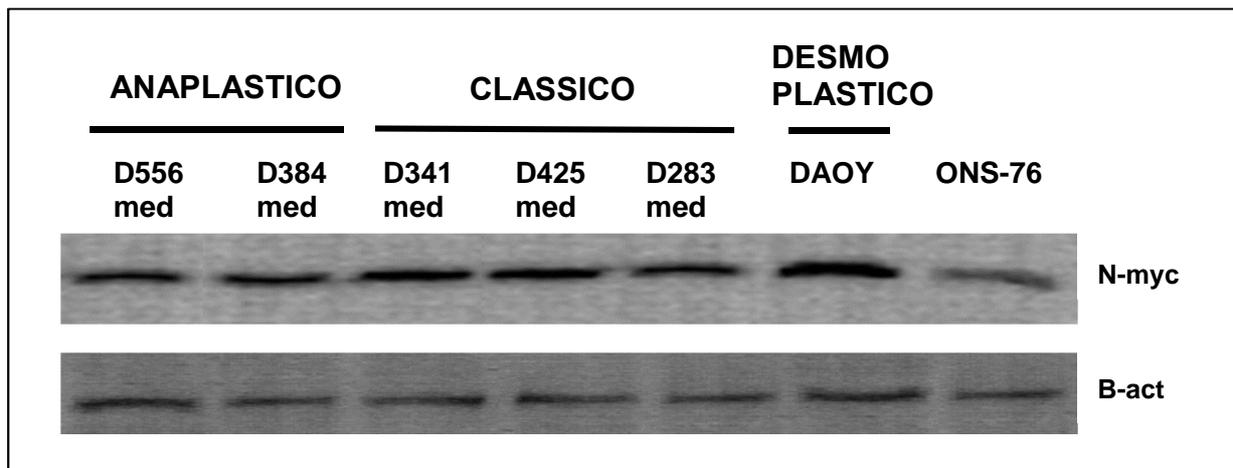
Inoltre è stata valutata la percentuale mRNA che esprime la quantità relativa d'espressione del gene *MYCN* nelle linee cellulari di Medulloblastoma.



**Grafico 2. Espressione basale di *MYCN* nelle linee cellulari di Medulloblastoma.**

Per verificare l'effettiva corrispondenza tra livelli genici e proteici relativi all'oncogene *MYCN* si è valutata mediante Western Blot, l'espressione basale della proteina N-Myc nelle diverse linee cellulari di Medulloblastoma utilizzate (Fig. 17).

Verificata l'espressione della proteina nelle cellule trattate, si procede valutando una seconda proteina, la B-actina in quanto quest'ultima viene costitutivamente espressa nelle cellule per cui rappresenta un utile mezzo di controllo al fine di esaminare che sia stata caricata un'uguale quantità di proteina sul gel.



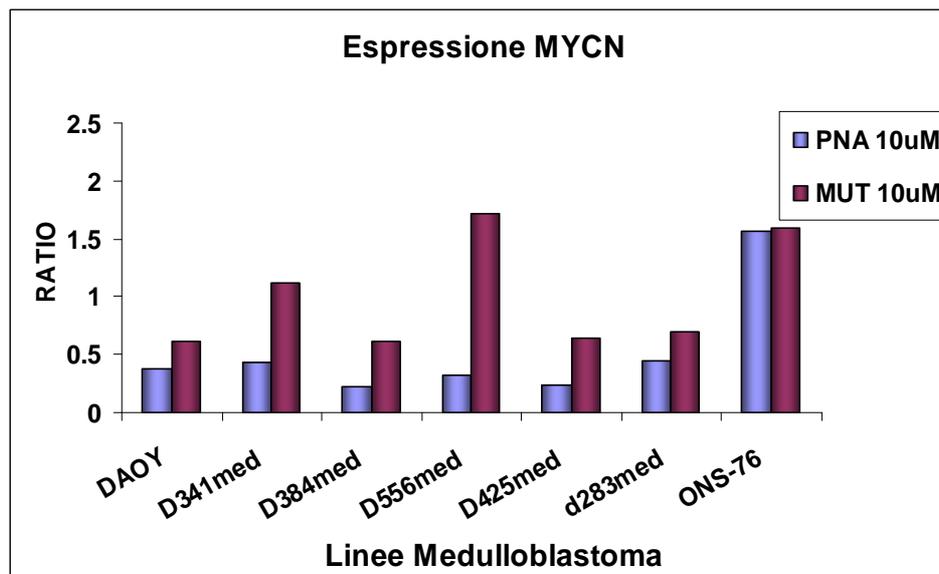
**Fig. 17** Visualizzazione dell'oncoproteina N-Myc nelle linee di Medulloblastoma

## 4.2 Valutazione *in vitro* del silenziamento genico

### 4.2.1 Analisi dell'espressione di *MYCN* in seguito a trattamento con PNA anti-gene anti-*MYCN*

Dopo aver analizzato i livelli basali d'espressione relativa all' oncogene *MYCN* per testarne l'effetto sul trascritto genico si è passato al trattamento con PNAwt Ag anti-*MYCN* e PNA mutato alla concentrazione finale di 10  $\mu$ M e l'espressione genica è stata osservata dopo 12 ore dal trattamento. Tale concentrazione si era mostrata sufficiente in altri esperimenti del laboratorio che prevedevano trattamenti di linee cellulari *MYCN*-amplificate ed il silenziamento era già apprezzabile a 12 ore dal trattamento

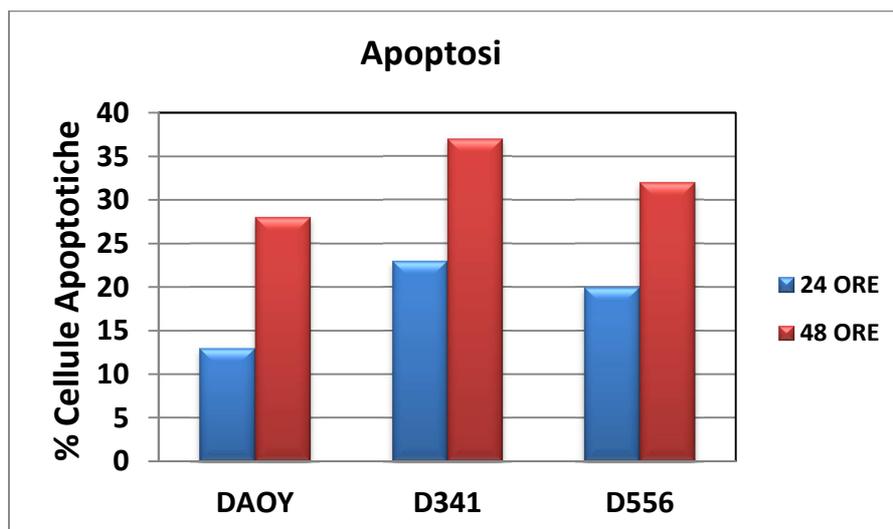
Come si può notare in grafico 3, vi è una significativa percentuale d'inibizione su tutte le linee cellulari tranne nel caso delle ONS-76. Questa linea cellulare richiede ulteriori approfondimenti perché i risultati ottenuti risultano controversi.



**Grafico 3. Percentuale d'espressione di mRNA dell'oncogene *MYCN* nelle linee di Medulloblastoma alle 12h dal trattamento con PNA<sub>wt</sub> Ag.**

#### 4.2.2 Valutazione della mortalità cellulare in seguito a trattamento con PNA anti-gene anti-*MYCN*.

Al fine di valutare la mortalità cellulare è stata condotta un'analisi di apoptosi in tre linee cellulari rappresentative dei tre sottotipi di MB più comuni: desmoplastico, classico ed anaplastico. I risultati ottenuti dimostrano che il PNA-*MYCN* ha l'abilità di indurre apoptosi in modo specifico nelle linee cellulari: DAOY (desmoplastica), con 13% e 28% di cellule apoptotiche alle 24 e 48 ore rispettivamente; D341 (classica) con il 23% e 37%; D556 (anaplastica) con una percentuale del 20% e 32%. Come si può notare nel grafico n°5, la percentuale di apoptosi è diversa alle 12 ore per arrivare alle 48 ore con una percentuale uguagliabile nel caso delle linee cellulari D341 e D556 e leggermente diversa nel caso della linea cellulare DAOY, probabilmente dovuto alla diversità di crescita cellulare.



**Grafico 4. Percentuale di cellule apoptotiche nelle linee cellulari di Medulloblastoma dopo trattamento con PNA<sub>wt</sub> Ag alle 24 e 48.**

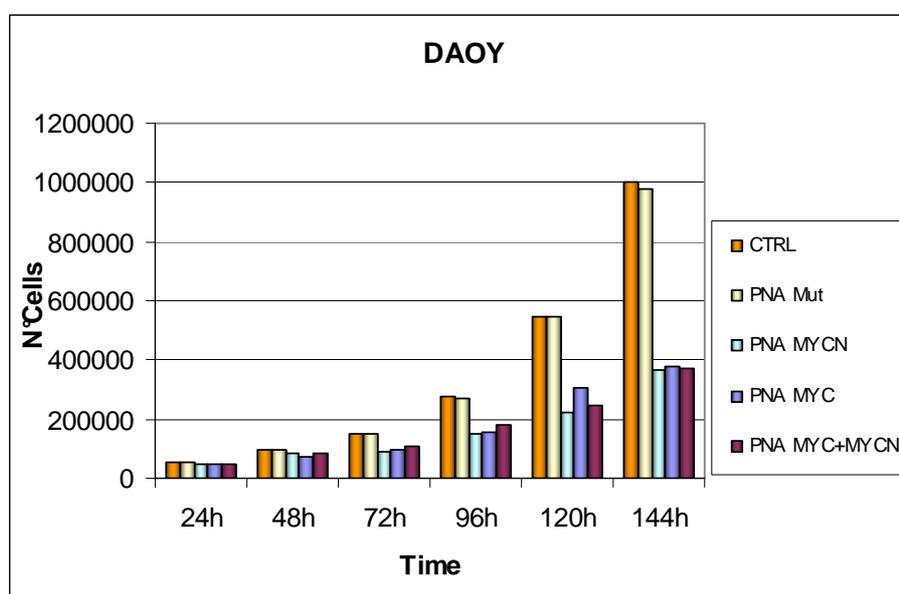
#### 4.2.3 Valutazione della vitalità cellulare in seguito a trattamento con PNA anti-gene anti-MYCN.

Sulle linee cellulari di Medulloblastoma è stato infine testato l'effetto del PNA anti-gene senso-NLS (PNA<sub>wt</sub> Ag) anti-MYCN ed anti-MYC sulla proliferazione cellulare utilizzando condizioni sperimentali precedentemente messe a punto nel laboratorio. In questo caso si è scelto altresì di trattare con un PNA anti-MYC per valutarne un eventuale effetto agonistico.

Osservando al microscopio ottico le diverse linee trattate si nota come la morfologia cellulare è alterata già dopo 12 ore dal trattamento e col passare del tempo sempre più cellule appaiono morte. La vitalità cellulare è stata valutata dopo 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 ore dal trattamento mediante la metodica ATPlite.

#### 4.2.4 Effetto del trattamento con PNA anti-gene anti MYCN/MYC sulla linea cellulare desmoplastica

Nel caso della linea cellulare desmoplastica (DAOY) l'effetto del trattamento diviene ben visibile al microscopio ottico dopo 96 ore dal trattamento quando si nota una ridotta densità cellulare se confrontata con le cellule di controllo (non trattate), esse infatti tendono a staccarsi dalla piastra e a formare aggregati di aspetto globoso, molto scuro con presenza di cellule morte. E' comunque significativamente rilevabile l'effetto del trattamento dal 3°giorno, dove la percentuale d'inibizione è del 43% per giungere alle 144 ore con un'inibizione del 61% sulle cellule trattate con PNA<sub>wt</sub> Ag anti-MYCN; in modo uguale anche il trattamento con PNA<sub>wt</sub> Ag anti-MYC dà buoni risultati. Il trattamento con PNA<sub>mut</sub> Ag, sostiene la specificità del PNA<sub>wt</sub> in quanto le cellule presentano uguale andamento del controllo. Dal concomitante trattamento con PNA<sub>wt</sub> Ag anti-MYCN/MYC non è riscontrabile un diverso effetto sulla crescita cellulare.



**Grafico 5: Andamento di crescita della variante desmoplastica di Mb rappresentata dalla linea cellulare DAOY a sei giorni di trattamento con PNA<sub>wt</sub> Ag e PNA<sub>mut</sub> Ag**

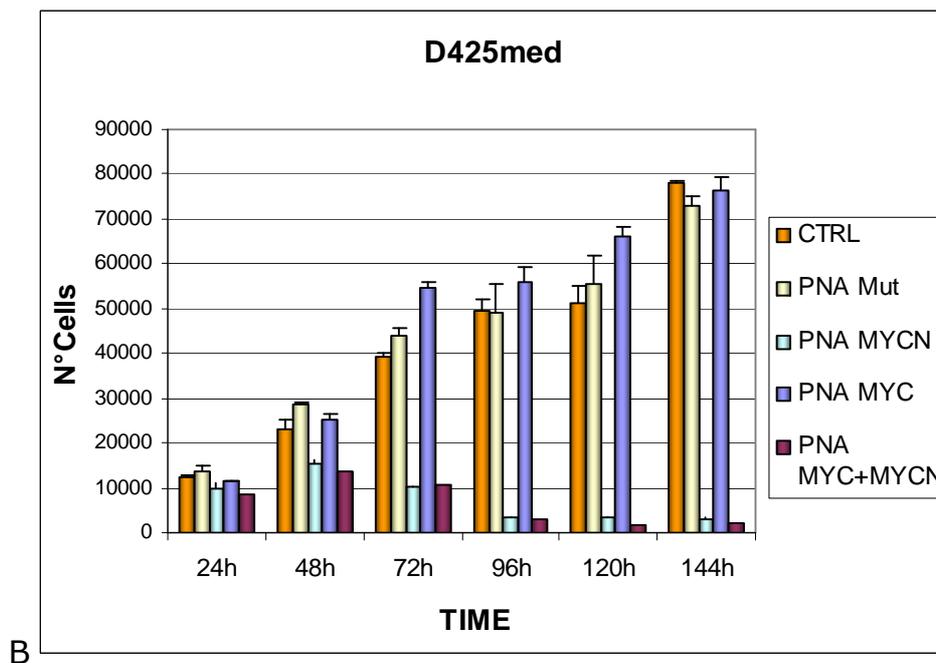
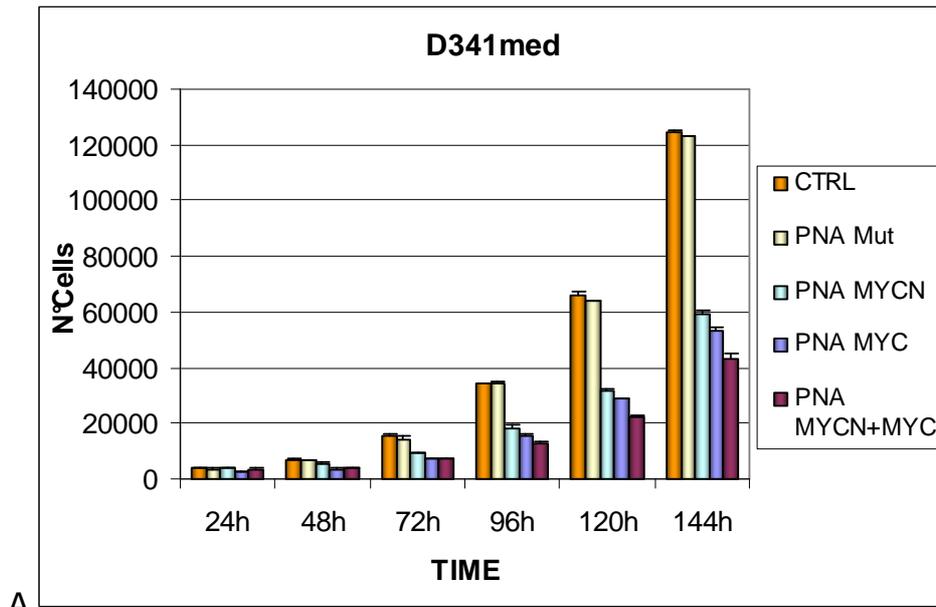
#### 4.2.5 Effetto del trattamento con PNA anti-gene anti MYCN/MYC sul sottotipo classico di Mb

Analogamente è stato fatto il trattamento a sei giorni sulle linee cellulari appartenenti al sottotipo classico (D341-D425med), utilizzando PNA<sub>wt</sub> Ag anti-MYCN e PNA<sub>mut</sub> Ag 10 µM.

In seguito al trattamento con il PNA<sub>wt</sub> Ag esse mostrano una ridotta capacità nella formazione dei cluster, mentre quelle trattate con PNA<sub>mut</sub> Ag non mostrano alcuna caratteristica che le differenzi dal controllo.

Le due linee esibiscono una diversa risposta: sulla linea cellulare delle D341med alle 24 ore non è riscontrabile l'effetto inibitorio ma all'aumentare del tempo diviene più evidente con un'inibizione del 31% alle 72 ore per raggiungere un'inibizione del 50% al 6°giorno; (Grafico 6). Rispetto a quanto osservato nell'altre linee cellulari questa, risulterebbe meno sensibile al trattamento verso MYCN ma con migliori risultati dati dal trattamento con PNA<sub>wt</sub> Ag anti-MYC dove viene raggiunta un'inibizione del 55%. Significativi sono anche i risultati dati dal trattamento combinato (PNA<sub>wt</sub> Ag anti-MYCN ed anti-MYC) anche se al momento non è applicabile *in vivo* in quanto comprometterebbe una cospicua batteria di geni, tra i quali anche alcuni deputati alle normali funzioni fisiologiche.

Sulla linea cellulare D425med l'effetto del PNA<sub>wt</sub> Ag anti-MYCN si nota già alle 24 ore, divenendo sempre più significativo fino a determinare al 6°giorno un netto calo della proliferazione che è del 4% rispetto al 93% del mutato, difatti quest'ultimo segue un andamento identico al controllo. I risultati dimostrano che tale linea cellulare sia più sensibile al trattamento rispetto alla precedente per quanto riguarda MYCN, ma non per l'effetto sull'oncogene MYC, che viene poco inibito.

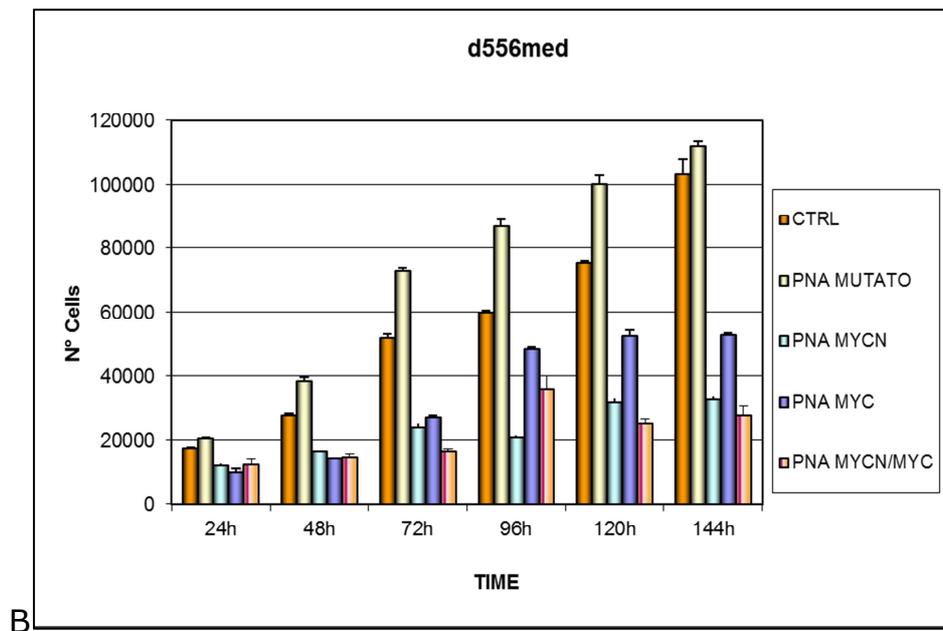
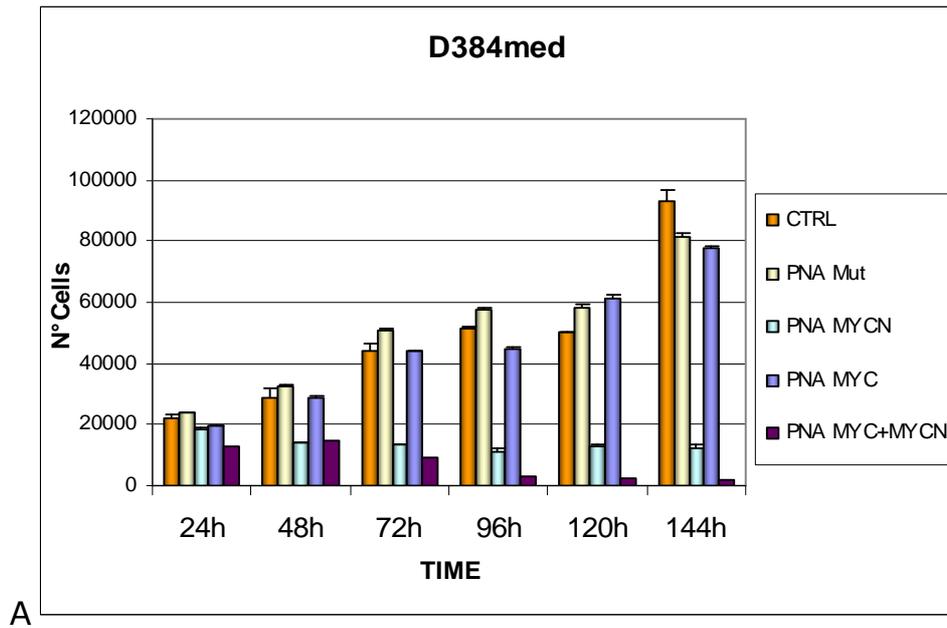


**Grafico 6: Andamento di crescita della variante classica di Mb rappresentata dalla linea cellulare D341med (A) e dalla linea cellulare D425med (B) a sei giorni di trattamento con PNA<sub>wt</sub> Ag e PNA<sub>mut</sub> Ag 10  $\mu$ M.**

#### 4.2.6 Effetto del trattamento con PNA anti-gene anti MYCN/MYC sul sottotipo anaplastico.

Importanti risultati si sono ottenuti anche sulla linea cellulare D384med (Grafico 7). Similmente alla linea delle D425med, le cellule trattate con PNA<sub>wt</sub> Ag anti-MYCN mostrano fin dal primo giorno del trattamento, una diminuzione della crescita con presenza di cluster molto più piccoli se confrontate con le cellule usate come controllo, mentre si ha poca inibizione col trattamento con PNA<sub>wt</sub> Ag anti-MYC. Valutando l'effetto del PNA<sub>mut</sub> Ag si ha un'ulteriore conferma della specificità del PNA<sub>wt</sub> Ag anti-MYCN.

Nella linea cellulare delle D556med si osserva un medesimo effetto inibente dovuto al trattamento e da una prima analisi al microscopio ottico è ben visibile la ridotta capacità proliferativa delle cellule trattate, dalla presenza di pochi cluster e da un elevato numero di cellule singole. Infatti dal saggio ATPlite si riscontra una percentuale d'inibizione sulla crescita del 46% fin dal primo giorno ma che presenta successivamente un andamento un pò altalenante fino a stabilizzarsi al 5°/6°giorno sul 76% d'inibizione. Ne deriva quindi, che in esse il PNA<sub>wt</sub> agisce ostacolando la normale formazione dei cluster, alterando conseguentemente la capacità proliferativa delle cellule. Nelle cellule trattate con il PNA<sub>mut</sub>, non vi è alcuna influenza sulla formazione dei cluster, permettendo così una crescita che simula l'andamento del controllo. Risulta altresì un effetto inibente col trattamento con PNA<sub>wt</sub> Ag anti-MYC con un'inibizione che tende a rimanere costante dalle 96 ore in poi (Grafico 7).



**Grafico 7: Andamento di crescita della della variante anaplastica di Mb rappresentata linea cellulare D384med (A) e D556med (B) a sei giorni di trattamento con PNA<sub>wt</sub> Ag e PNA<sub>mut</sub> Ag 10  $\mu$ M.**

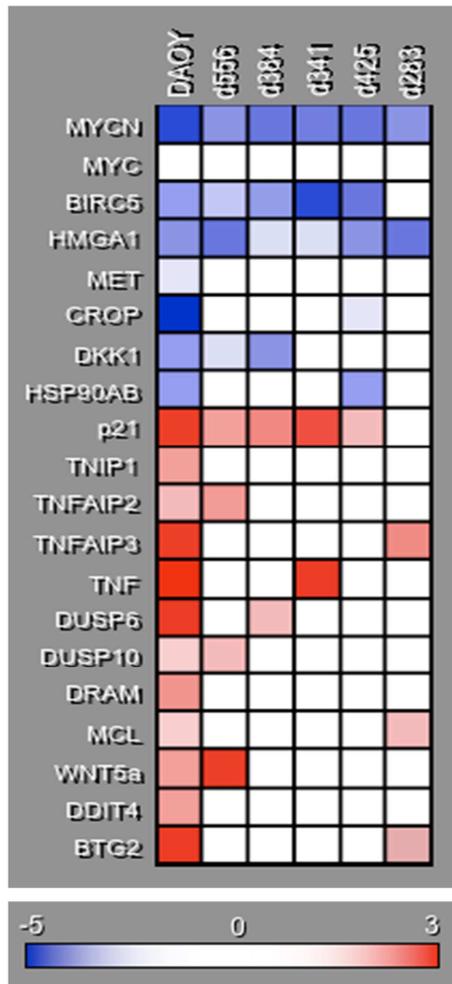
#### 4.2.7 Caratterizzazione della risposta molecolare dopo trattamento con PNA antigene anti-MYCN

Mediante uno studio effettuato analizzando più di 40.000 geni grazie alla tecnica *microarray* in cellule di Medulloblastoma Desmoplastico (DAOY), si sono individuati dei geni con diverso profilo di espressione tra le cellule di controllo e quelle trattate con il PNAwt. Dopo un'analisi più attenta è stato possibile raggruppare questi geni in diversi pathways tra cui quelli più interessanti sono risultati quelli dell'apoptosi e ciclo cellulare.

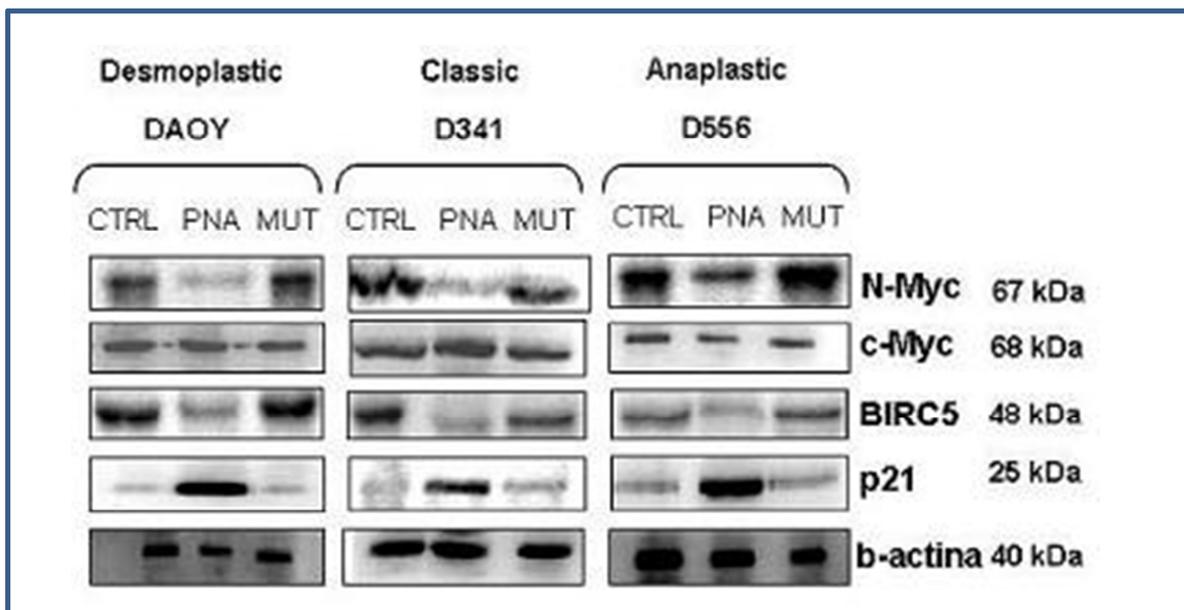
Sono stati validati tramite real time (RT-PCR) alcuni geni candidati significativamente variati nell'esperimento di *microarray* nelle linee cellulari DAOY (MB desmoplastico), D556 e D384 (MB anaplastico), D425, D341, D283 (MB classico).

Il gene promotore del tumore BIRC5 è risultato essere diminuito in tutte le linee di medulloblastoma analizzate, mentre il gene anti-tumorale p21 è risultato essere attivato in tutte le linee di medulloblastoma analizzate (con eccezione della linea D283med). Altri geni sono stati confermati in alcune linee cellulari e comprendono anche geni del pathway di WNT come i geni WNT5A e DKK1. In tutti i casi, il silenziamento con PNA-MYCN non variava l'espressione del oncogene omologo MYC, indicando una specificità di azione del PNA-MYCN (Grafico 8).

In seguito, il risultato relativo ai geni: MYCN, MYC, BIRC5 e p21 è stato confermato analizzando l'espressione della proteina in tre linee cellulari rappresentative dei tre diversi sottotipi istologici: desmoplastico, classico ed anaplastico. È stata riscontrata una risposta già alle 12h nei campioni trattati con PNA-anti MYCN se confrontato col rispettivo controllo. La specificità dell'effetto è stata dimostrata utilizzando un PNA mutato che non ha avuto alcun effetto inibente (Fig.18).



**Grafico 8: Validazione in RT-PCR dei geni candidati significativamente variati nell'esperimento di microarray in DAOY**



**Figura 18: Analisi dell'espressione proteica dei geni candidati significativamente variati nell'esperimento di microarray.**

## 4.3 Modello *Xenograft* ortotopico di medulloblastoma

### 4.3.1 Espressione stabile della luciferasi in linee cellulari di medulloblastoma

Le linee cellulari DAOY, D341med e D556med sono state infettate con retrovirus ricombinante ottenuto mediante sistema di packaging. Gli stock virali sono utilizzati per l'infezione di quattro aliquote cellulari. In seguito alla selezione per 10 giorni con geneticina 1 mg/ml sono state ottenute 4 popolazioni clonali, due per ciascuna linea cellulare. Il saggio della luciferasi, effettuato con il kit Steady-Glo<sup>®</sup> Luciferasi Assay System (Promega), ha permesso di verificare la funzionalità enzimatica della luciferasi prodotta dalle linee trasformate (Grafico 9).

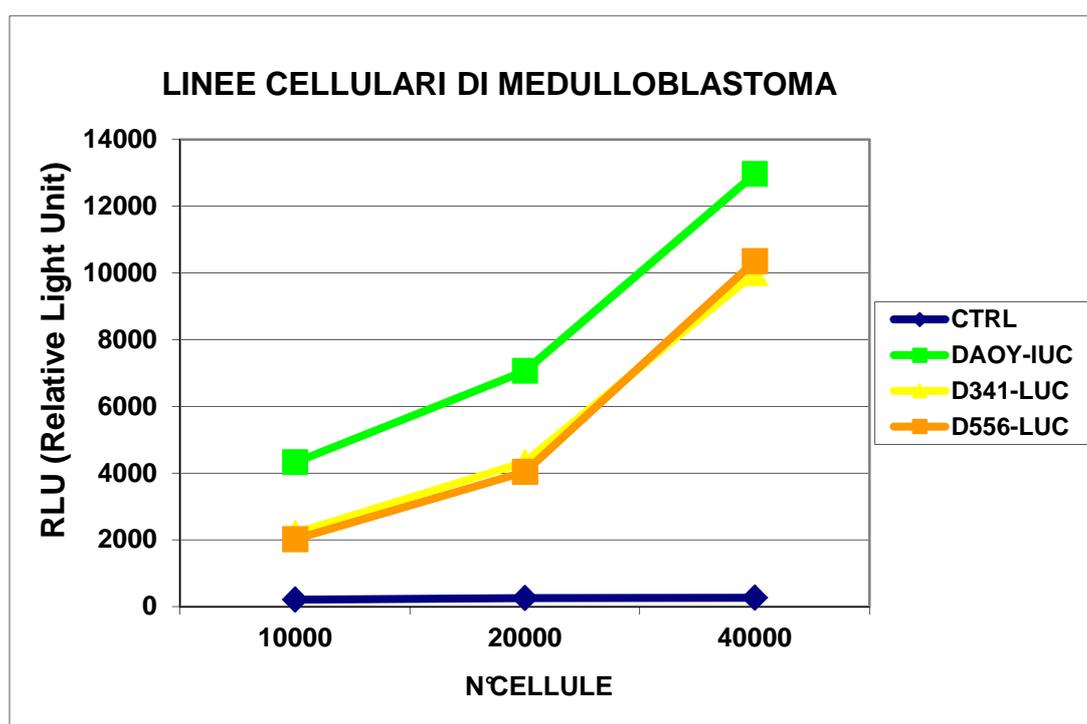
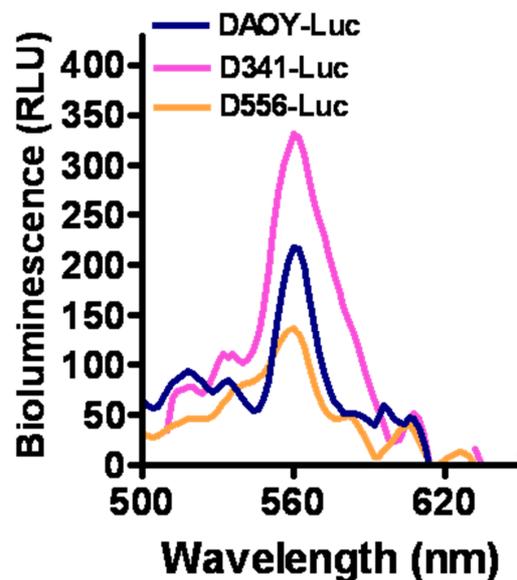


Grafico 9: Saggio della funzionalità dell'enzima luciferasi

#### 4.3.2 Valutazione dello spettro d'emissione della luciferasi in linee cellulari di medulloblastoma

L'analisi dello spettro d'emissione della luciferasi, ottenuto dopo l'aggiunta di D-luciferina a cellule intere, ha permesso di verificare la presenza del picco d'emissione atteso. Nel grafico è riportato lo spettro d'emissione delle popolazioni clonali utilizzate per i successivi inoculi, che presentano il picco d'emissione a 560 nm, caratteristico della luciferasi di *Photinus pyralis* clonata nel vettore.

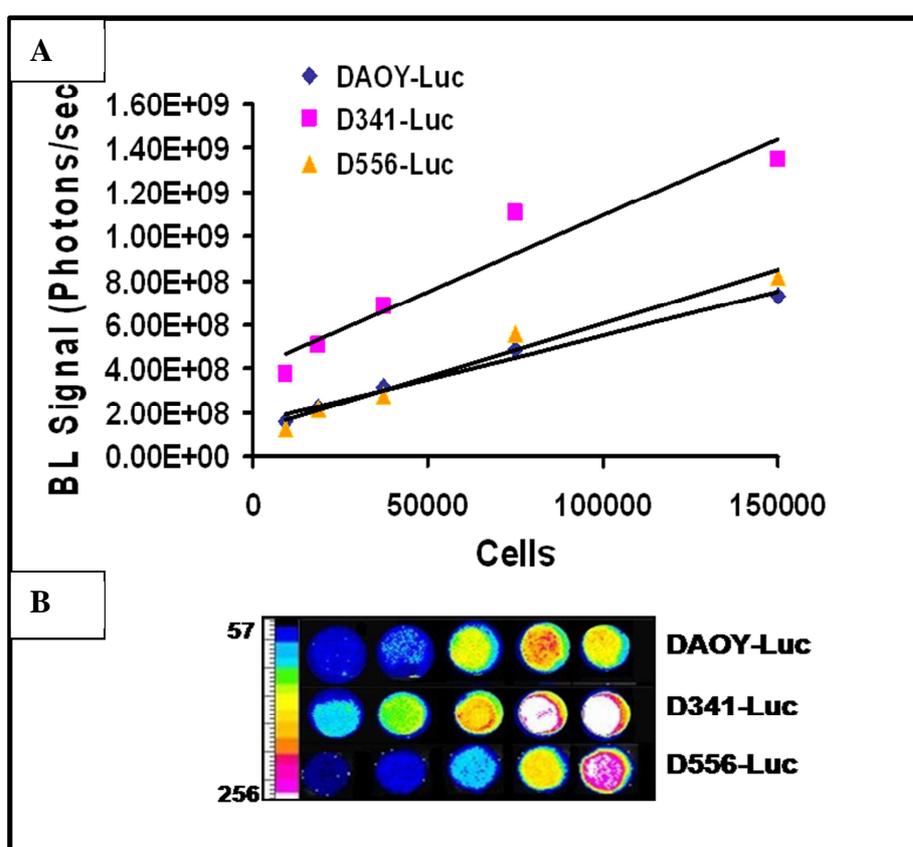


**Grafico 10: Analisi dello spettro in cellule vive intere dopo un minuto dall'aggiunta di D-luciferina.**

Il grafico 10 mette in evidenza differente espressione del gene della luciferasi nei tre cloni testati. La linea D341-Luc mostra infatti un picco molto più ampio rispetto alle linee DAOY-Luc e D556-Luc.

### 4.3.3 Validazione *in vitro* del segnale di bioluminescenza in linee cellulari di medulloblastoma

Il segnale luminoso dei rispettivi cloni è stato analizzato tramite il luminometro Berthold NightOwl LB981. In particolare l'analisi ha messo in evidenza una proporzionalità diretta tra il numero di cellule ed il segnale emesso dalle stesse, riscontrabile anche nell'immagine a pseudocolori (Grafico 11-A/B).



**Grafico 11: Validazione *in vitro* del segnale di bioluminescenza in cellule di medulloblastoma trasformate**

Il segnale di bioluminescenza risulta, come lecito aspettarsi, meno pronunciato per le linee DAOY-Luc e D556-Luc rispetto alla linea D341-Luc; tale proporzione è infatti in pieno accordo con i dati ottenuti dall'analisi dello spettro.

#### 4.3.4 Sviluppo del modello *Xenograft* ortotopico di medulloblastoma in bioluminescenza

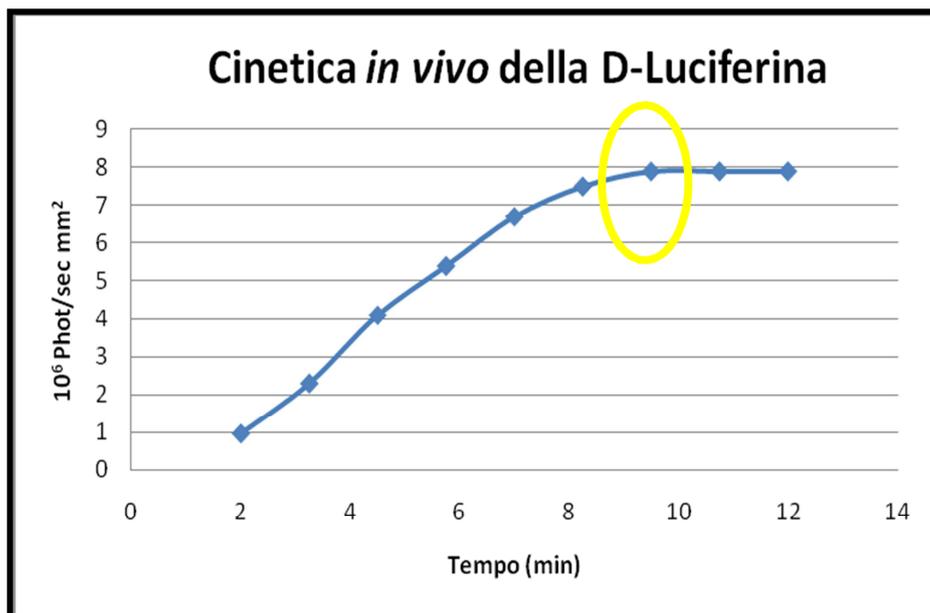
Quindici esemplari murini tra i tre ed i quattro giorni di vita inoculati nell'emisfero cerebellare destro con cellule competenti per il gene luciferasi (rispettivamente cinque per ciascuna linea: desmoplastica, classica ed anaplastica) hanno definito un'incidenza del 100%.

Gli animali, dopo l'inoculo, sono stati monitorati sia tramite esame di bioluminescenza *in vivo* sia tramite esame macroscopico per valutare il loro stato di salute.

#### 4.3.5 Valutazione della cinetica del segnale di bioluminescenza *in vivo*

La determinazione della cinetica di biodistribuzione della D-luciferina, effettuata *in vivo* ha permesso di individuare l'intervallo temporale in cui il segnale risulta stabile e di massima intensità. Qui di seguito vengono riportate le acquisizioni eseguite per 1 minuto, ad intervalli di 15 secondi, per 15 minuti complessivi.

Le quantificazioni ottenute hanno evidenziato un picco massimo del segnale a decorrere all'ottavo minuto che si mantiene stabile fino ai 12 minuti, ne consegue che tutti i successivi scan verranno acquisiti a tempi successivi agli 8 minuti (Grafico 12).



**Grafico 12: Cinetica della D-luciferina *in vivo***

#### 4.3.6 Valutazione della crescita tumorale mediante tecnica di bioluminescenza *in vivo*

Ciascun animale è stato sottoposto ad esame di bioluminescenza mediante luminometro Berthold NightOwl LB981 al fine di rilevare la presenza della massa tumorale formata. Agli animali, precedentemente anestetizzati, viene iniettata d D-Luciferina alla concentrazione di 150mg/Kg. Sono state in seguito fatte scansioni a partire dall'ottavo minuto dalla somministrazione del substrato. La figura 19, rappresentativa dei quindici esemplari (cinque per ogni sottotipo istologico), mettono in evidenza l'evoluzione della massa tumorale già presente dopo la prima settimana post-inoculo contrassegnata da segnale luminescente rappresentato in figura qualitativamente come immagine in pseudocolori (Fig.19 A) o quantitativamente come numero di fotoni emessi dalla massa tumorale (Fig.19 B).

Grazie all'utilizzo della tecnica di *bio-imaging* è stato possibile riscontrare una diversa latenza e progressione tumorale dipendente dai tre sottotipi istologici di Mb.

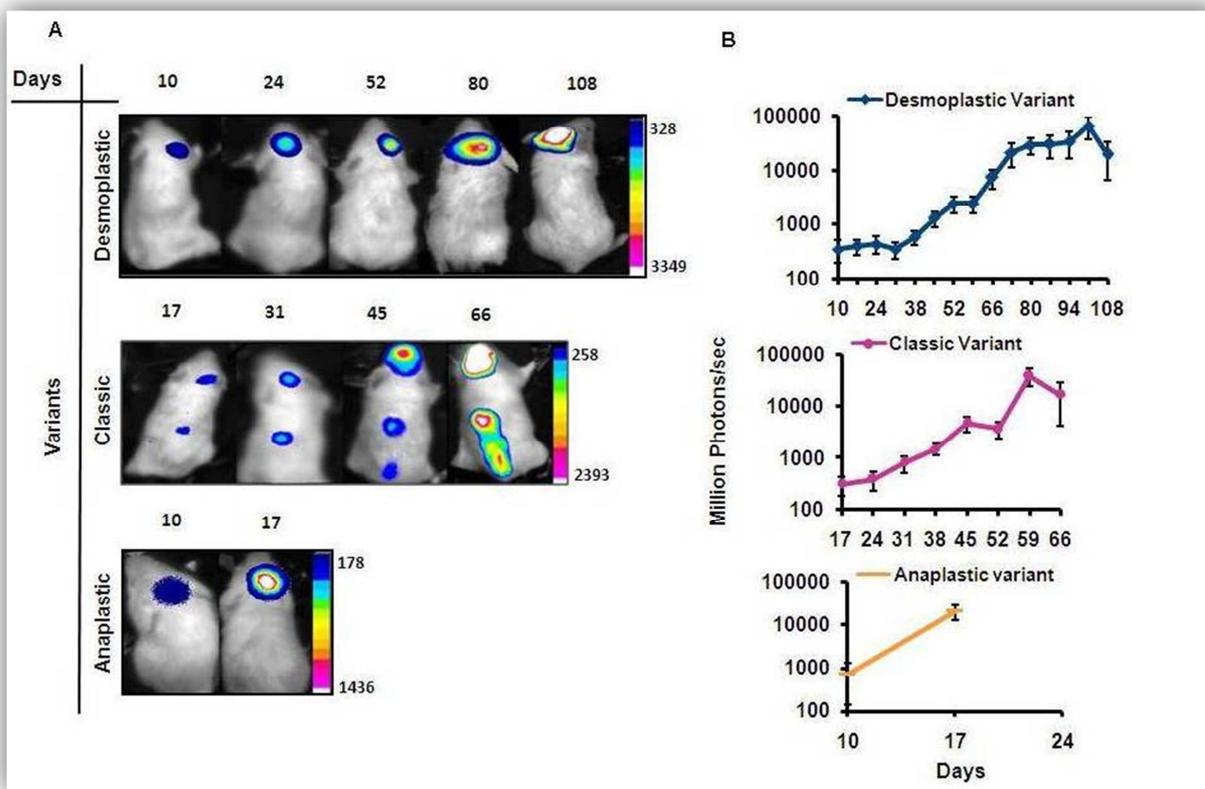
Il modello *xenograft* ortotopico desmoplastico con una latenza di dieci giorni ed una progressione di ca. tre mesi si è dimostrato essere il modello con migliore prognosi rispetto al modello ortotopico classico ed anaplastico.

Nel caso del modello *xenograft* ortotopico *classico* si è riscontrata una latenza di ca. diciassette giorni ed una progressione di due mesi. Interessante è stato rilevare anche nel modello murino così come nell'umano, la sua tendenza a metastizzare negli emisferi cerebrali e lungo la colonna vertebrale.

Il modello *xenograft* ortotopico anaplastico è risultato quello con maggiore aggressività ed invasività con una progressione tumorale di soli venti giorni.

I modelli murini messi a punto utilizzando tre principali varianti di Mb presentano un'incidenza del 100% ed un'ottima riproducibilità

Tutti e tre i modelli rispecchiano lo stesso andamento clinico delle corrispettive varianti nel modello umano, rendendo tali modelli validi per studi preclinici.



**Figura 19: Progressione tumorale *in vivo* tramite imaging bioluminescente**

#### 4.4 Trattamento chemioterapico *in vivo*

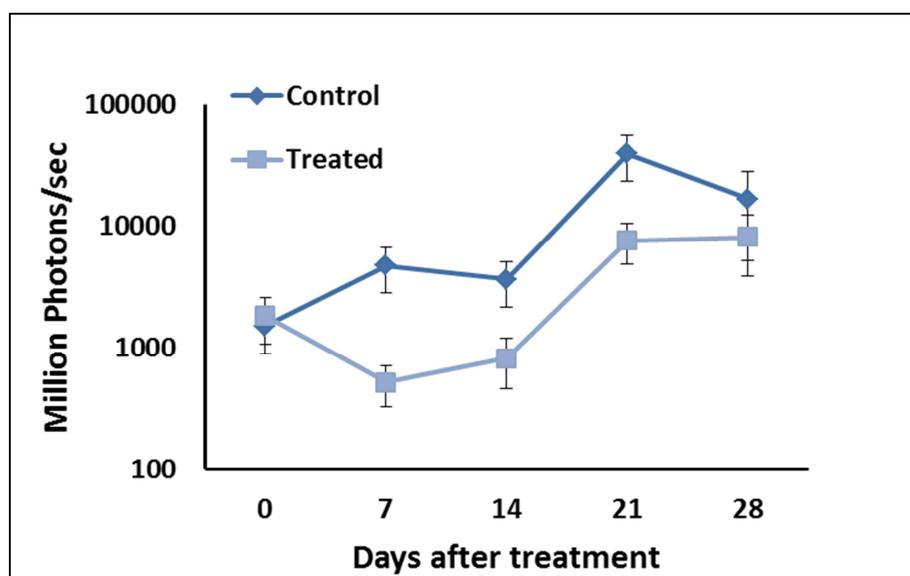
Per validare i modelli *xenograft* ortotopici di Mb si è scelto di trattare un gruppo di cinque animali appartenenti al sottotipo classico con un regime chemioterapico, seguendo un protocollo clinico per Mb ad alto rischio.

I topi sono stati trattati a trentotto giorni dall'inoculo in una fase di crescita esponenziale del tumore, seguendo un ciclo terapeutico settimanale.

Dai risultati è emerso un'iniziale risposta chemioterapica rilevata dalla tecnica di bio-imaging che è andata man mano decrescendo fino ad arrivare a fine trattamento con un segnale di bioluminescenza correlato alla crescita tumorale del tutto paragonabile al segnale detectato nel

gruppo di animali di controllo senza variazioni nella curva di sopravvivenza.

Questo risultato non è stato del tutto sorprendente in quanto si tratta di un tumore solido altamente aggressivo, normalmente curato col concomitante ricorso alla resezione chirurgica seguita da radio e chemioterapia. Lo scopo è stato la validazione del modello allestito, l'individuazione di una finestra chemioterapica e l'identificazione della sensibilità della tecnica di bioimaging nel detectare anche piccole variazioni nella crescita tumorale (Grafico 13).



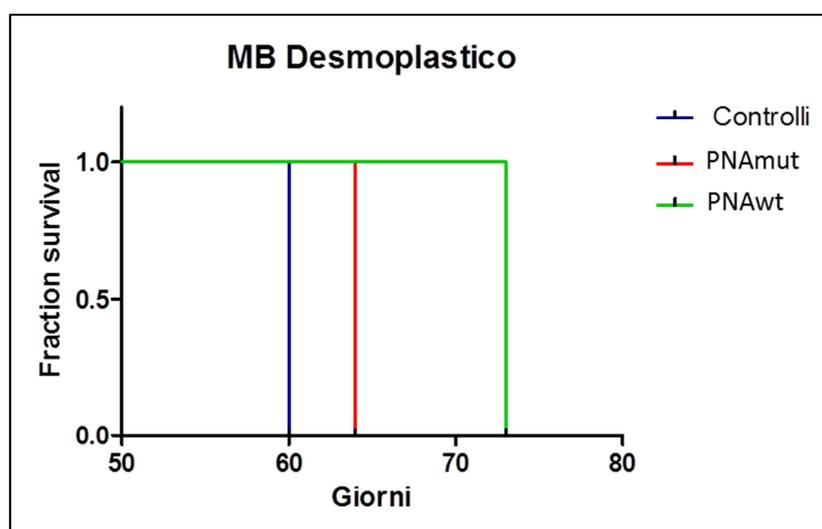
**Grafico 13: Risposta chemioterapica *in vivo* tramite imaging bioluminescente**

#### 4.5 Trattamento *in vivo* con il PNA-NLS anti-MYCN

A seguito del trattamento chemioterapico si è potuto mettere a punto un protocollo per il trattamento *in vivo* col PNA-NLS anti-MYCN . In questo caso si è scelto un gruppo di tre animali appartenenti al modello desmoplastico. Scelta dettata dall'età dell'animale e dalla più lenta progressione tumorale capace di offrirci il tempo necessario per l'impianto della pompa osmotica e la rilevazione di un eventuale effetto terapeutico della molecola testata.

Da questo primo esperimento pilota si sono ottenuti dei buoni risultati in termini di un' aumentata sopravvivenza di ca. venti giorni in più degli animali trattati con PNAwt rispetto agli animali di controllo trattati con PNAmut o con soluzione fisiologica.

Dati preliminari ma incoraggianti per un futuro studio preclinico della molecola inibitrice di MYCN in combinazione con protocolli chemioterapici, in tumori in cui vi sia una deregolazione dell'oncogene (Grafico 14).



**Grafico 14: Trattamento *in vivo* con PNA-NLS anti-MYCN**

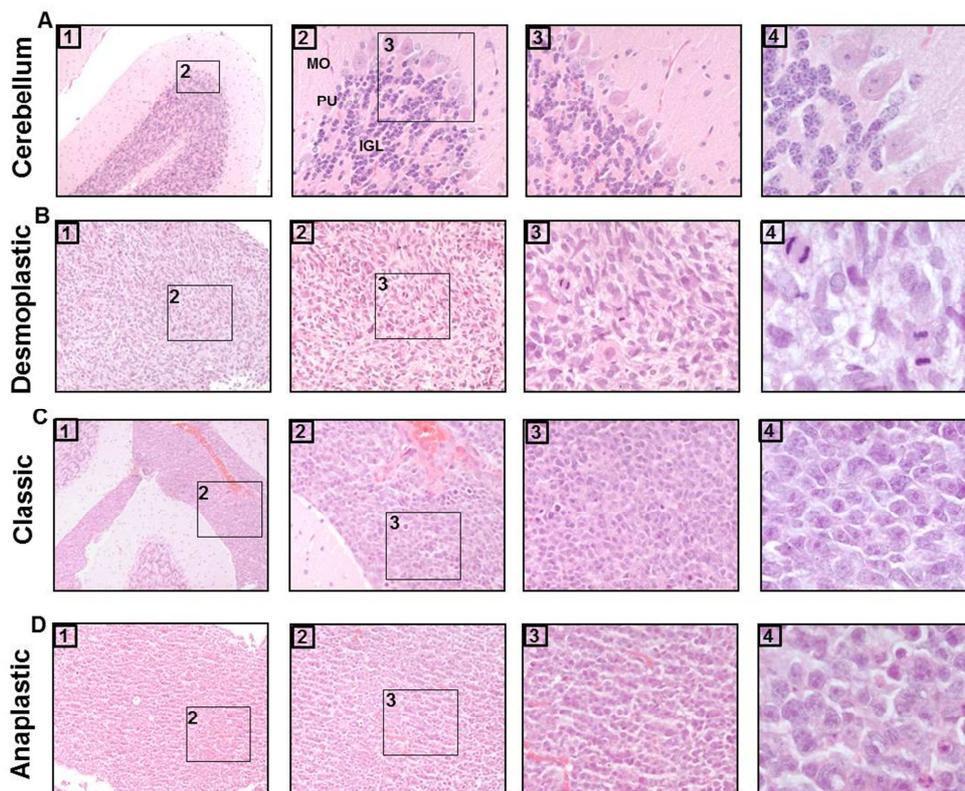
## 4.6 Esame istologico

I campioni tumorali analizzati tramite colorazione H&E, hanno mostrato caratteristiche istologiche simili alle tre più comuni varianti di MB (Fig20).

I tessuti tumorali derivanti dall'inoculo di cellule DAOY hanno mostrato caratteristiche tipiche del corrispettivo sottotipo desmoplastico con differenziazione neuroblastica, lenta crescita e tumore localizzato.

Nel caso dei tumori derivanti dall'impianto di cellule D341 appartenenti al sottotipo classico si è evidenziata la presenza di piccole cellule con un alto rapporto nucleo:citoplasma. Inoltre, si è rilevata la presenza di metastasi nell'emisfero cerebrale e lungo la colonna vertebrale. Risultato in accordo con l'andamento di questo particolare sottotipo nell'uomo.

Infine nei tumori derivanti dall'inoculo di cellule D556 appartenenti al sottotipo anaplastico si nota un alto polimorfismo con la presenza di grandi nuclei ed andamento altamente aggressivo ed invasivo.



**Fig.20: Esame istologico su campioni bioptici derivanti dai modelli murini xenograft ortotopici di Mb.**

# 5

## Conclusioni

---

Il Medulloblastoma è una neoplasia embrionale maligna ad levata cellularità classificato come tumore neuroectodermico, rappresentante con il 20%, il più comune fra i tumori solidi pediatrici. Attualmente solo il 50-60% dei pazienti vengono curati pur mostrando gravi effetti collaterali spesso associati a problemi cognitivi, dovuti alla chemio e radio terapia.

Sebbene le cause siano ancora sconosciute si ritiene che vi sia in una vasta proporzione di MB un malfunzionamento all'origine nella proliferazione dei precursori dei granuli (GCPs): le cellule più abbondanti del cervelletto, del quale ne determinano la morfologia adulta.

Tale step risulterebbe critico nello sviluppo della neoplasia, pertanto in questo lavoro si sono focalizzati gli esperimenti sull'inibizione specifica dell'oncogene *MYCN*, principale attore e responsabile del pathway deputato alla proliferazione sregolata delle cellule dei granuli.

Inoltre, recentemente si è identificato un altro gruppo di medulloblastomi (gruppo D) in cui vi è il coinvolgimento di *MYCN* in termini di over-espressione o amplificazione (*P. A. Northcott.2011*).

Lo studio si è avvalso dell'utilizzo di una molecola inibitrice, PNA anti-gene anti-*MYCN* (PNA<sub>wt</sub> Ag), che esplica la propria azione a livello del processo trascrizionale dell'oncogene *MYCN*. Per far ciò il PNA<sub>wt</sub> Ag viene associato ad una sequenza "NLS" che ne facilita l'entrata nel nucleo, ed è utilizzato ad una concentrazione di 10µM, che risultata essere efficace ma non tossica per le cellule. L'effettiva entrata del PNA-NLS nella cellula e la sua localizzazione nucleare erano state precedentemente dimostrate in altri

studi condotti presso il nostro laboratorio analizzando al microscopio a fluorescenza l'uptake cellulare di un PNA-NLS rodaminato.

La specificità di azione del PNA anti-gene NLS è stata valutata mediante il concomitante utilizzo di un PNA mutato anti-*MYCN* (PNA<sub>mut</sub>-NLS).

Pertanto lo studio è stato articolato in due fasi, con una prima analisi *in vitro* ed una successiva fase *in vivo* a conferma dei dati ottenuti.

Gli esperimenti *in vitro* sono stati condotti su linee cellulari di Medulloblastoma rispettivamente: DAOY, D341med, D425med, D384med e D556med. Tali linee cellulari sono state trattate col PNAwt Ag anti *MYCN*/*MYC* per sei giorni utilizzando condizioni già precedentemente testate, atte a rilevare l'effettiva inibizione data dal peptide nucleico.

Buoni risultati si sono ottenuti sull'inibizione dell'oncogene *MYCN* in tutte le linee cellulari anche se in percentuali diverse. Molto interessante è la linea D384med nella quale si raggiunge un'inibizione del 74% confermata dall'mRNA valutato in qPCR che diminuisce fino a raggiungere solo il 20% d'espressione rispetto al controllo. Altrettanto significativi sono i risultati sulle linee DAOY, D341med e D556med sia a livello della proliferazione cellulare che della trascrizione genica.

I risultati ottenuti sono in relazione con i livelli di espressione dell'oncogene *MYCN* nelle diverse linee cellulari.

Dall'insieme degli esperimenti condotti si evidenzia una forte risposta specifica delle cellule di Medulloblastoma al trattamento con PNA anti-gene anti-*MYCN* a livello trascrizionale e traduzionale

Il ruolo di *MYCN* come oncogene nel MB e l'efficacia del PNA dimostrata *in vitro* hanno stimolato ad ampliare la sperimentazione *in vivo*. aprendo uno spiraglio intorno allo sviluppo di un agente terapeutico basato sull'azione del PNA e diretto verso particolari forme di tumori pediatrici che mostrano sovra-espressione/amplificazione dell'oncogene *MYCN*.

Lo scopo della fase *in vivo* del progetto è stato quello di sviluppare un modello murino preclinico di MB per testare l'effetto del PNA anti-gene anti-*MYCN*.

Quale risultato della sperimentazione *in vivo* si sono ottenuti tre modelli

murini di MB, appartenenti ai tre sottotipi istologici più comuni: desmoplastico, classico ed anaplastico.

L'utilizzo di cellule ingegnerizzate esprimenti il gene della luciferasi, ha permesso di utilizzare una tecnica di imaging bioluminescente *in vivo*, capace di monitorare l'evoluzione tumorale fin dalle prime fasi di sviluppo con ottima sensibilità, specificità e assoluta assenza di tossicità, riducendo il numero di animali destinati alla sperimentazione.

Inoltre, l'utilizzo di topi neonati ha permesso di evitare tecniche chirurgiche per l'inoculo delle cellule ed una più appropriata simulazione della condizione umana in cui il medulloblastoma si evolve nelle prime fasi di sviluppo .

A riprova dell'attendibilità, i tre modelli murini di Mb hanno mostrato molte caratteristiche simili alla controparte umana, in accordo con le tre varianti istologiche confermate tramite esame istologico quali appartenenti ai sottotipi: desmoplastico/nodulare, classico ed anaplastico secondo la classificazione corrente sancita dalla World Health Organization 2007 (WHO).

Dunque, i topi derivanti dall'inoculo con cellule DAOY (variante desmoplastica) hanno mostrato una più lunga sopravvivenza rispetto ai topi inoculati con le cellule D341 (variante classica), ed ai topi inoculati con le cellule D556 (variante anaplastica) in accordo con l'outcome clinico che vede la variante desmoplastica quella con prognosi migliore, seguita dalla variante classica ed anaplastica. Quest'ultima conosciuta come la variante con peggiore prognosi e spiccata aggressività.

Successivamente, per validare i modelli e per investigare su un nuovo approccio terapeutico si è scelta di trattare i topi appartenenti alla variante classica, con chemioterapici normalmente usati in protocolli clinici.

La tecnica di bioluminescenza ha permesso di valutare la risposta terapeutica che ha mostrato una iniziale inibizione della crescita tumorale nei topi trattati, che ha raggiunto nelle fasi successive lo stesso andamento dei topi di controllo senza mostrare differenze nella

sopravvivenza. Risultato non sorprendente trattandosi di tumori aggressivi normalmente trattati con resezione chirurgica, radioterapia e chemioterapia, ma utile per confermare l'adeguatezza della tecnica di bioluminescenza per valutare la progressione tumorale e passare alla validazione dell'effetto del PNA *in vivo*.

Dunque, utilizzando la tecnica messa a punto si sono trattati tre topi per ciascun gruppo ottenendo dei buoni risultati in termini di sopravvivenza nei topi trattati con PNAwt rispetto ai topi di controllo trattati con PNAmut un primo gruppo e soluzione fisiologica, un secondo gruppo.

In conclusione, i buoni risultati d'inibizione ottenuti sia *in vitro* che *in vivo* aprono uno spiraglio intorno allo sviluppo di un agente terapeutico basato sull'azione del PNA che potrà essere incluso nei protocolli terapeutici e diretto verso particolari forme di tumori pediatrici che mostrano sovraespressione dell'oncogene *MYCN*.

## 6

Bibliografia

---

**L.Kochbati,N.Bouaouina,D.Hentati,C.Nasr, M.Besbes et al (2006).**

*Medulloblastoma with extracranial nervous system metastases: clinical presentation and risk factors.* Cancer radiotherapy 10: 107-111.

**Eberhart CG, Cohen KJ, Tihan T, et al (2003).**

*Medulloblastomas with systemic metastases: evaluation of tumor histopathology and clinical behaviour in 23 patients.* J Pediatr Hematol Oncol 25: 198–203.

**D.N.Louis, H.Ohgaki, O.D.Wiestler et al (2007).**

*The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.* Acta Neuropathol 114:97-109.

**David W. Ellison (2010).**

*Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease.* Acta Neuropathol 120:305-316.

**Kortmann RD, Kuhl J, Timmermann B, et al (2000)**

*Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of Medulloblastoma in childhood: results of the German prospective randomized trial HIT '91.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 46: 269–79.

**Paul A. Northcott • David J. H. et al (2011).**

*Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples.* Acta Neuropathol

**Paul A. Northcott, Andrey Korshunov et al (2011)**

*Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants.* J Clin Oncol 29:1408-1414.

**Marc Remke, Thomas Hielscher et al (2011).**

*Adult Medulloblastoma Comprises Three Major Molecular Variants.* J.Clin Oncol 29:2717-2723.

**D. Williams Parsons, Meng Li et al (2011).**

*The Genetic Landscape of the Childhood Cancer Medulloblastoma.* Science 331:435-438.

**Silvia Marino (2005).**

*Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control.* Molecular Medecine 11:1.

**Tracy-Ann Read, B. Hegedus, R. Wechsler-Reya et al (2006).**

*The Neurobiology of Neurooncology.* Ann Neurol 60: 3-11.

**D. Ellison (2002).**

*Classifying the Medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics.*

Neuropathology and Applied Neurobiology 28: 257-282.

**Su X, Gopalakrishnan V, et al. (2006)**

*Abnormal expression of REST/NRSF and Myc in neural stem/progenitor cells causes cerebellar tumors by blocking neuronal differentiation.* Mol Cell Biol. 26(5):1666-78.

**Matthew R. Grimmer and William A. Weiss (2006).**

*Childhood tumors of the nervous system as disorders of normal development.* Current Opinion in Pediatrics 18: 634-638.

**Knoepfler, P. S.; Cheng, P. F.; Eisenman, R. N (2002).**

*N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation.* Genes Dev., 16, 2699-2712.

**Kenney AM, Cole MD, Rowitch DH. (2003).**

*Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors.* Development 130:15–28.

**Rao G, Pedone CA, Valle LD, et al (2004).**

*Sonic hedgehog and insulin-like growth factor signaling synergize to induce Medulloblastoma formation from nestin-expressing neural progenitors in mice.* Oncogene 23: 6156–6162.

**Mill P, Mo R, Hu MC, et al (2005).**

*Shh controls epithelial proliferation via independent pathways that converge on N-Myc. This article explores the role of Gli repressor and activator forms, as well as the interplay of the PI3K pathway with hedgehog through GSK-3b.* Dev Cell 9:293–303.

**Grandori, C. and R.N. Eisenman (1997).**

*Myc target genes.* Trends Biochem Sci, 22(5): p. 177-81.

**Solomon, D.L., B. Amati, and H. Land (1993).**

*Distinct DNA binding preferences for the c-Myc/Max and Max/Max dimers.* Nucleic Acids Res 21: 5372-6.

**Schwab, M., et al (1984).**

*Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc.* Nature, 308(5956): p. 288-91.

**Leonetti, C., I. D'Agnano, et al (1996).**

*“Antitumor effect of c-myc antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides on human melanoma cells in vitro and in mice.” J Natl Cancer Inst 88(7): 419-29.*

**Sakamuro, D., V. Eviner, et al (1995).**

*“c-Myc induce apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms.” Oncogene 11(11): 2411-8.*

**Pession Andrea and Tonelli Roberto (2005).**

*The MYCN Oncogene as a specific and selective drug target for peripheral and central nervous system tumors. Current Cancer Drug Targets 5: 273-283.*

**Strieder, V. and W. Lutz, (2002).**

*Regulation of N-myc expression in development and disease. Cancer Lett., 180(2): p. 107-19.*

**Bayani, J.; Zielenska, M.; Marrano, P.; Kwan et al (2000).**

*Molecular cytogenetic analysis of Medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors*

*by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping. J.*

*Neurosurg., 93, 437-448.*

**Aldosari, N.; Bigner, S. H, Burger, P. C, et al (2002).**

*MYCC and MYCN oncogene amplification in Medulloblastoma. A fluorescence in situ hybridization study on*

*paraffin sections from the Children's Oncology Group. Arch. Pathol. Lab. Med 126, 540-544.*

**Pomeroy, S. L.; Tamayo, P.; Gaasenbeek, M.; Sturla et al (2002).**

*Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. Nature 415, 436-442.*

**Raffel, C.; Jenkins, R. B.; Frederick, L.; Hebrink, D. et al (1997).**

*Sporadic Medulloblastomas contain PTCH mutations. Cancer Res., 57, 842-845.*

**Nielsen PE, Egholm M, et al (1991).**

*Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. Science 6;254(5037):1497-500.*

**Egholm M, Buchardt O et al (1993).**

*PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. Nature. 7;365(6446):566-8.*

**Brown SC, Thomson SA et al (1994).**

*NMR solution structure of a peptide nucleic acid complexed with RNA.* Science. 5;265(5173):777-80.

**Egholm M, Christensen L, et al (1995).**

*Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA.* Nucleic Acids Res. 25;23(2):217-22.

**Demidov VV, Potaman VN, et al (1994).**

*Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts.* Biochem Pharmacol.15;48(6):1310-3.

**Hyrup B, Nielsen PE et al (1996).**

*Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications.* Bioorg Med Chem.;4(1):5-23.

**Kurg R, Langel U et al (2000).**

*Inhibition of the bovine papillomavirus E2 protein activity by peptide nucleic acid.* Virus Res.;66(1):39-50.

**Nielsen PE, Egholm M, et al (1993).**

*Peptide nucleic acids (PNAs): potential antisense and anti-gene agents.* Anticancer Drug Des.;8(1):53-63.

**Vickers TA, Griffith MC, et al (1995).**

*Inhibition of NF-kappa B specific transcriptional activation by PNA strand invasion.* Nucleic Acids Res.;23(15):3003-8.

**Bentin T, Nielsen PE (1996).**

*Enhanced peptide nucleic acid binding to supercoiled DNA: possible implications for DNA "breathing" dynamics.* Biochemistry;35(27):8863-9.

**Wittung P, Kajanus J, et al.(1995).**

*Phospholipid membrane permeability of peptide nucleic acid.* FEBS Lett.;375(3):27-9.

**Boffa L.C., Morris P.L. et al. (1996).**

*“Invasion of the CAG triplet repeats by a complementary peptide nucleic acid inhibits transcription of the androgen receptor and TATA binding protein genes and correlates with refolding of an active nucleosome containing a unique AR gene sequence.”* J Biol Chem 271(22): 13228-13233.

**Tyler B.M., Jansen K. et al. (1999).**

*“Peptide nucleic acids targeted to the neurotensin receptor and administered i.p. cross the blood-brain barrier and specifically reduce gene expression.”* Proc Natl Acad Sci USA 96(12): 7053-7058.

**Ray, A. and B. Norden (2000).**

*“Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future.”* Faseb J 14(9): 1041-60.

**Tyler B.M., McCormick D.J. et al. (1998).**

*“Specific gene blockade shows that peptide nucleic acids readily enter neuronal cells in vivo.”* FEBS Let 421(3): 280-284.

**Basu S. and Wickstrom E. (1997).**

*“Synthesis and characterization of a peptide nucleic acid conjugated to a D-peptide analog of insulin-like growth factor 1 for increased cellular uptake.”* Bioconj Chem 8(4): 481-488.

**Norton J.C., Piatyszek M.A. et al. (1996).**

*“Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids.”* Nat Biotech 14(5): 615-619.

**Faruqi A.F., Egholm M. et al (1998).**

*“Peptide nucleic acid-targeted mutagenesis of a chromosomal gene in mouse cells.”* Proc Natl Acad Sci USA 95(4): 1398-1403.

**Branden U., Mohamed A.J. et al (1999).**

*“A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA.”* Nat Biotechnol 17(8): 784-787.

**Tonelli R., Pession A. et al (2005).**

*Antigene peptide nucleic acid specifically inhibits MYCN expression in human neuroblastoma cells leading to cell growth inhibition and apoptosis.* Mol. Cancer Ther 4(5).

**Hamilton S.E., Simmons C.G. et al (1999).**

*“Cellular delivery of peptide nucleic acids and inhibition of human telomerase.”* Chem\_Biol 6(6): 343-51.

**Hanvey, J. C., N. J. Peffer, et al (1992).**

*“Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids.”* Science 258(5087): 1481-5.

**Braun, K., et al, (2004).**

*HPV18 E6 and E7 genes affect cell cycle, pRB and p53 of cervical tumor cells and represent prominent candidates for intervention by use peptide nucleic acids (PNAs).* Cancer Lett. 8;209(1):37-49.

**Cutrona. G., et al, (2003).**

*Inhibition of the translocated c-myc in Burkitt's lymphoma by a PNA complementary to the E mu enhancer.* Cancer Res.1;63(19):6144-8.

**Sun, L., et al,(2002).**

*Antisense peptide nucleic acids conjugated to somatostatin analogs and targeted at the n-myc oncogene display enhanced cytotoxicity to human neuroblastoma IMR32 cells expressing somatostatin receptors.* Peptides.23(9):1557-65.

**Pession, A., et al, (2004).**

*Targeted inhibition of NMYC by peptide nucleic acid in N-myc amplified human neuroblastoma cells: cell-cycle inhibition with induction of neuronal cell differentiation and apoptosis.* Int J Oncol, 24(2): p. 265-72.

**Sharpless, N.E., et al, (2006).**

*The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development.* Nat Rev Drug Discov. Sep;5(9):741-54.

**Sadikot R., et al., (2005).**

*Bioluminescence Imaging.* Proc Am Thorac Soc 2:537-540

**Rehemtulla, A., et al., (2000).**

*Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging.* Neoplasia. 2000;2(6):491-5.

**Dohlen G., et al., (2008).**

*Antioxidant Activity in the Newborn Brain: A Luciferase Mouse Model.* Neonatology;93:125-131

**Blesch A., (2003).**

*Lentiviral and MLV based retroviral vectors ex vivo and in vivo gene transfer.* Methods;33:164-172

**Bigner SH, McLendon RE,et al.(1997).**

*Chromosomal characteristics of childhood brain tumors.* Cancer Genet Cytogenet.;97(2):125-134.

**Vassal G, Boland I et al.(1997).**

*Potent therapeutic activity of irinotecan (CPT-11) and its schedule dependency in medulloblastoma xenografts in nude mice.* Int J Cancer;73(1):156-63.

**Houghton PJ, Morton CL, et al. (2007).**

*The pediatric preclinical testing program: description of models and early testing results.* *Pediatr Blood Cancer*;49(7):928-40.

**White L, Sterling-Levis K (2008).**

*Multiagent chemotherapy studied in a xenograft model of medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumour: analysis of the VETOPEC regimen.* *J Clin Neurosci.*;15(1):49-54.

**Sylvian Bauer and Paul H. Patterson (2006).**

*Leukemia Inhibitory Factor Promotes Neural Stem Cell Self-Renewal in the Adult Brain.* *The Journal of Neuroscience*, 26(46):12089 –12099 • 12089

**Gondi CS, Lakka SS, et al.(2004).**

*RNAi-mediated inhibition of cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis and tumor growth in gliomas.* *Oncogene*; 23(52):8486-96.

**Di C, Liao S, Adamson DC, et al.(2005).**

*Identification of OTX2 as a medulloblastoma oncogene whose product can be targeted by all-trans retinoic acid.* *Cancer Res.*;65(3):919-924.

**De Haas T, Oussoren E, et al. (2006).**

*OTX1 and OTX2 expression correlates with the clinicopathologic classification of medulloblastomas.* *J Neuropathol Exp Neurol.*;65(2):176-186.

**Friedman HS, Colvin OM, et al.(1992).**

*Cyclophosphamide resistance in medulloblastoma.* *Cancer Res.*;52(19):5373-5378.

**Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM (1985).**

*Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice.* *J Neuropathol Exp Neurol.*;44(5):472-485.