
Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**BIOTECNOLOGIE, FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA:
progetto n.2 “Farmacologia e Tossicologia”**

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 05/G1

Settore Scientifico disciplinare: BIO14

*Effetti dell’inibizione di Tanchirasi in linee cellulari di
Medulloblastoma umano*

Presentata da: Dott. Cristiano Renna

Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof.
Giorgio Cantelli Forti

Relatore
Chiar.ma Prof.ssa
Giovanna Cenacchi

Esame finale anno 2013



INDICE

INTRODUZIONE.....	5
- Il Medulloblastoma	5
Generalità.....	5
Classificazione, istogenesi e varianti istocitopatologiche	6
Markers prognostici e stratificazione del rischio	8
Sistemi molecolari implicati nella patogenesi del MB	13
Il pathway Sonic hedgehog (SHH)	14
Il Pathway ERBB	16
Il Pathway NOTCH	17
Il Pathway p53/ARF	17
Il Pathway WNT	18
- La radioterapia nel Medulloblastoma	21
Aspetti generali	21
Risposta biologica alle radiazioni ionizzanti (RI)	23
I meccanismi di riparazione dei DSBs	26
Homologous recombination (HR)	26
Non-homologous end-joining (NHEJ)	26
Radioterapia e Medulloblastoma	28
Prospettive future in radioterapia	29
- Target therapy	30
Antibody-targeted therapy	30
Ligand-mediated therapy	31
Small molecule	32
- Un membro della famiglia delle PARP come possibile bersaglio terapeutico: Tanchirasi	33
La famiglia delle PARP	33
Tanchirasi	34
Generalità	35
Interazioni funzionali di Tanchirasi	35
Tanchirasi e DNA-PKcs nella radiosensibilità cellulare	37
XAV939:studi del trattamento in vivo e in vitro	38
SCOPO DELLA TESI	41
MATERIALI E METODI	43
- Linee cellulari	43

- Trattamento farmacologico e/o con radiazioni	43
XAV939	44
Radiazioni Ionizzanti	44
- Western blotting (WB)	44
Preparazione dei lisati totali	45
Preparazione dei lisati nucleari	45
Quantificazione proteica	46
Corsa elettroforetica, blotting e rilevazione dei dati	46
Corsa elettroforetica su gel a gradiente (3.5% - 12%)	48
- Curve di crescita	49
- Valutazione della mortalità cellulare	49
- Analisi della capacità clonogenica	50
- Neutral Comet Assay	51
Silanatura dei vetrini	51
Preagarizzazione dei vetrini	51
Trattamento dei campioni (con XAV939 e/o radiazioni)	52
Inclusione in agarosio	52
Lisi delle cellule	53
Corsa elettroforetica	53
Colorazione e acquisizione delle immagini	53
Analisi dei vetrini	53
- Analisi statistica dei dati	54
RISULTATI	55
- XAV939 inibisce il pathway WNT e la subunità catalitica del complesso DNA-PK in linee cellulari di MB	55
- Il trattamento congiunto di XAV939 e RI induce una forte inibizione della capacità proliferativa e clonogenica	57
- XAV939 induce una minore capacità di riparare il danno double strand del DNA indotto dalle RI	60
- L'inibizione farmacologica di TNKS induce una maggiore mortalità cellulare in cellule trattate con RI	64
DISCUSSIONE	68
BIBLIOGRAFIA	74

INTRODUZIONE

Il Medulloblastoma

Generalità

Il medulloblastoma (MB) è il più frequente tumore cerebrale maligno dell'età pediatrica. Insorge nel cervelletto (80% nel verme e 20% negli emisferi) ed è più comune nei maschi che nelle femmine. L'incidenza è di circa 5 individui su milione, prevalentemente in età compresa tra 0 e 14 anni. Il picco di incidenza si colloca in corrispondenza dell'ottavo anno, sebbene in una significativa percentuale di casi (30%) il tumore si sviluppi in età adulta, addirittura in pazienti anziani [1, 2, 3].

È un tumore invasivo e a rapida crescita e può spesso diffondersi ad altre parti del Sistema Nervoso Centrale (SNC). Ha infatti una spiccata tendenza a metastatizzare con maggiore frequenza in specifiche aree quali: SNC, midollo osseo, ossa, linfonodi e polmoni. Il potenziale metastatico è inferiore nell'adulto rispetto al bambino. Al momento della diagnosi circa un terzo dei pazienti presenta disseminazione tumorale nel SNC, soprattutto a carico del midollo osseo, raggiungibile attraverso il liquido cefalo rachidiano; raramente si individuano foci metastatici in sede extraneurale [4].

Il MB è un tumore sporadico ma in alcuni casi è possibile individuare una predisposizione genetica associata alla presenza di patologie ereditarie, quali: Sindrome di Turcot di tipo 2, Sindrome dei Nevi Multipli Basocellulari (NBCCS) o di Gorlin (1%-2% dei pazienti), Sindrome di Li-Fraumeni e Sindrome di Rubstein Taybi [5]. Nella Sindrome di Turcot di tipo 2, ad esempio, la patologia è associata a mutazioni nella linea germinale del gene oncosoppressore APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), coinvolto nel sistema di trasduzione del segnale WNT (*Wingless Type*) ed è responsabile di una condizione patologica nota come Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP): studi

epidemiologici rivelano che, individui affetti da FAP hanno un rischio relativo di contrarre tumori cerebrali primitivi, come il MB, 92 volte più elevato rispetto alla popolazione generale [6].

Il MB, come approfondiremo più avanti, è un tumore altamente radiosensibile e la radioterapia è la pratica medica d'elezione per la cura di questa neoplasia. Il suo utilizzo nella clinica è fortemente limitato dai conseguenti severi effetti collaterali soprattutto a livello endocrino [7] e cognitivo [8], oltre che da una radioresistenza intrinseca che si riscontra in circa un terzo dei pazienti.

È una neoplasia morfologicamente eterogenea e all'esame neuropatologico si distinguono 4 varianti istocitopatologiche [9], caratterizzate da una prognosi e da una radorisposta sensibilmente diverse.

Classificazione, istogenesi e varianti istocitopatologiche

La *World Health Organization* (WHO) annovera il MB fra i tumori embrionali del SNC [10]. Una classificazione più precisa è complessa, a causa dell'incerta origine istogenetica del tumore. Si è dibattuto a lungo sulla possibilità di annoverare il MB fra i tumori neuroectodermici primitivi (PNET, *Primitive Neuroectodermal Tumors*) in quanto almeno un sottogruppo di MB, la variante desmoplastica, origina dalle cellule dello strato dei granuli esterni (EGL, *External Granular cell Layer*) del cervelletto presentando istogenesi assimilabile a quella dei PNET. Tuttavia il MB si differenzia dai PNET per diversi aspetti molecolari, la diversa risposta alla radio- e chemioterapia e a alcune alterazioni genetiche che hanno orientato la WHO a classificare il MB separatamente dai PNET [2, 9].

Il MB è una neoplasia morfologicamente eterogenea e presenta diverse varianti istologiche che differiscono per struttura delle cellule tumorali, per organizzazione e composizione della matrice extracellulare e per indici mitotici e apoptotici.

All'esame neuropatologico si distinguono le seguenti varianti: classico, desmoplastico, anaplastico, a larghe cellule (LC) e ad estesa nodularità (MBEN), Fig. 1; di questi sottotipi l'anaplastico e il MB a larghe cellule coesistono spesso in un *continuum* di malattia a prognosi infausta denominato LC/A e insieme concorrono al 12%-25% dei MB [11, 12].

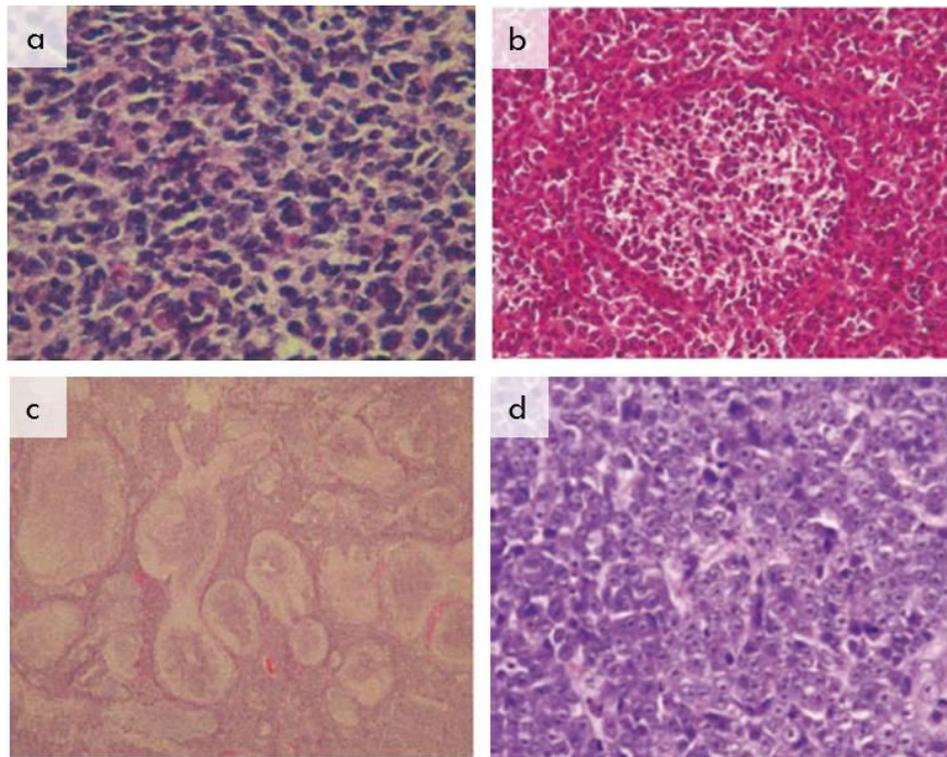


Fig. 1. Varianti istologiche di medulloblastoma: **a)** medulloblastoma classico; **b)** medulloblastoma desmoplastico/nodulare; **c)** medulloblastoma ad estesa nodularità; **d)** medulloblastoma a grandi cellule/anaplastico. Riprodotta da Ellison, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2002.

La variante “classica” è la più comune (circa il 70% dei casi), presenta un’alta densità cellulare, cellule di piccole dimensioni con un elevato rapporto nucleo/citoplasma e nucleo ipercromico di forma tondo-ovale. Si può osservare un’alta percentuale di nuclei apoptotici e aree di necrosi non omogeneamente distribuite [13].

La variante “desmoplastica” (15% dei casi) presenta un’architettura bifasica della lesione. La desmoplasia, intesa come deposito di collagene a livello pericellulare, può presentarsi in associazione con un’architettura nodulare o separatamente da essa. I noduli costituiscono dei microambienti caratterizzati principalmente da cellule apoptotiche sparse, differenziamento neurocitico e basso indice proliferativo. Queste caratteristiche fenotipiche contrastano con quelle delle regioni internodali, altamente indifferenziate, con un’accentuata attività mitotica e cellule fortemente pleomorfe.

La variante “ad estesa nodularità”, o MBEN, che rappresenta l’1% dei casi, è caratterizzata da cellule intranodali che mostrano una marcata differenziazione neuronale associata alla presenza di un feltro fibrillare [14].

Il MB “a grandi cellule”, o anaplastico, (10%) è caratterizzato da grandi cellule pleomorfe, con nuclei larghi e nucleoli evidenti. Le aree di necrosi sono spesso abbondanti ed estese, l’attività mitotica e apoptotica è elevata [15].

Markers prognostici e stratificazione del rischio

Nella stratificazione del rischio si tiene conto di tre importanti fattori prognostici:

- Età del paziente al momento della diagnosi: nei bambini di età inferiore a tre anni il rischio che il tumore progredisca sfavorevolmente nei cinque anni successivi alla diagnosi è nettamente più alto, determinato anche dalle restrizioni terapeutiche che l’età impone;
- Estensione dei residui neoplastici post-operatori: se i residui post-operatori superano l’estensione di 1,5 cm² si ha una prognosi peggiore;

-
- Metastasi tumorali: la presenza, al momento della diagnosi, di metastasi nel SNC o extraneurali, rappresenta sicuramente un fattore prognostico negativo [5].

La classificazione adottata negli USA distingue così due gruppi di pazienti: quelli a rischio standard con alta percentuale di sopravvivenza a 5 anni (intorno al 70%) e quelli ad alto rischio, che presentano invece uno o più fattori prognostici negativi, per i quali la sopravvivenza a 5 anni è drasticamente più bassa (25%). In Europa il rischio viene attribuito sulla base dell'età del paziente in base alla dimensione/localizzazione del tumore oltre che alla presenza di metastasi [4].

Inoltre è ormai riconosciuto come caratteristiche istopatologiche possano essere prese seriamente in considerazione per cercare di predire il comportamento biologico e la capacità di rispondere alle terapie del MB.

Per esempio, i MBEN hanno, in genere, una prognosi migliore in quanto il grado di nodularità (indicativo, come detto, di una maggiore differenziazione in senso neuronale) è esteso. I MB LC/A (caratterizzati da maggiore differenziamento) sono invece quelli associati a prognosi peggiore.

Aspetti di anaplasia si possono riscontrare in tutti i sottotipi di MB e le lesioni sono piuttosto eterogenee perciò gradi diversi di anaplasia possono essere presenti all'interno dello stesso tumore [12]. In un recente studio, Giangaspero e collaboratori, suggeriscono una classificazione basata sul grado di anaplasia (lieve, moderata e severa) evidenziando un'aggressività tumorale crescente e una prognosi sfavorevole. La concreta possibilità di utilizzare questa classificazione è però limitata dal fatto che il grado di anaplasia in campioni di MB è spesso di difficile valutazione; ciò nonostante, nella maggior parte dei casi, la sola istologia riesce a discriminare tra prognosi sensibilmente diverse e quindi rimane un importante strumento per distinguere tra loro pazienti ad alto o a basso rischio [16].

Ad oggi, quindi, la classificazione del rischio si basa solo sui parametri clinici riportati ad inizio paragrafo, risultando comunque imprecisa, in quanto pazienti classificati come “rischio standard” potrebbero richiedere un trattamento clinico più incisivo e pazienti definiti ad “alto rischio” ricevono trattamenti più invasivi del necessario.

Per questo, negli anni, sono stati identificati e proposti diversi marcatori genetici e molecolari per perfezionare la stratificazione del rischio anche se nessuno di essi attualmente è entrato nella pratica clinica.

La perdita del braccio corto del cromosoma 17, l'anomalia citogenetica più frequente nel MB (presente in più del 50% dei casi) è stata associata ad un comportamento biologico aggressivo del tumore [17]. È comunque difficile abbinare questo specifico aspetto ad una particolare variante istopatologia: i dati riportati in letteratura sono discordanti poiché alcuni lavori riportano che essa è sempre associata al tipo a LC/A [18] mentre altri autori l'hanno ritrovata in tutte le varianti anche se più frequentemente in quelle non desmoplastiche [17].

Il gene p53, che è localizzato sul cromosoma 17, è mutato in una bassa percentuale dei casi (10%), nonostante l'elevata frequenza dell'aberrazione cromosomica [3,19,20]. Nell'uomo, la delezione di questa proteina predispone all'insorgenza del MB, come avviene nella sindrome di Li Fraumeni [19]. Elevati livelli di espressione di p53 (che indicano una proteina mutata e non funzionante) sono inoltre associati a prognosi negativa [19] e alterazioni del pathway oncosoppressore p53-ARF sono implicate nella patogenesi del MB.

Nel complesso, il pathway p53-ARF è coinvolto nel 20% circa dei casi, considerando anche alterazioni di altre componenti della via di segnalazione, come ad esempio la delezione del gene e la metilazione del promotore di p14^{ARF} o l'iperespressione di MDM2, che hanno comunque l'effetto di inibire l'attività di p53 [19].

Alterazioni del pathway p53 sono più frequenti nell'istotipo LC/A, associato anche a amplificazione di c-Myc; si ipotizza che, come avviene in altre

neoplasie, l'amplificazione di c-Myc e i deficit nel pathway p53-ARF cooperino nella formazione di questo sottotipo di MB.

L'amplificazione del gene che codifica per c-Myc si verifica nel 10-15% dei casi, mentre in una percentuale minore è possibile riscontrare iperespressione dell'mRNA di c-Myc senza l'amplificazione dell'oncogene: in entrambi i casi l'oncogene è associato ad una prognosi sfavorevole [21].

Il MB è uno dei rari casi di tumore cerebrale associato ad una alta frequenza di metastatizzazione. Per questo motivo, numerosi studi si sono concentrati sull'individuazione di profili d'espressione indicativi del potenziale metastatico del tumore. MacDonald e collaboratori, analizzando i profili di espressione genica di due diversi gruppi di MB (metastatici e non metastatici), hanno evidenziato 85 geni espressi diversamente nelle due classi. In particolare si è dimostrato il coinvolgimento, nei MB metastatici, di proteine appartenenti alla famiglia del PDGFR (*plated-derived growth factor receptor alpha*) e delle MAPK, protein chinasi che lavorano a valle di Ras [22].

Più in generale, si può concludere affermando che l'amplificazione di c-Myc e/o la sua *over-espressione* [21, 23], le aberrazioni del cromosoma 17 [24, 25], la mutazione per TP53 (gene di p53) o una forte immunoreattività per p53 [26, 27] e alti livelli di PDGFR e delle MAPK [22] possono tutti essere considerati dei possibili marker molecolari di una prognosi negativa.

Sono stati comunque identificati anche altri markers indicatori invece di una prognosi meno infausta come l'espressione dell'mRNA per TrkC [28, 29] e la traslocazione nucleare di β -catenina, indicativa dell'attivazione del sistema WNT [30, 31].

TrkC è il recettore della neurotrofina 3 ed è associabile nel MB ad una prognosi meno infausta in quanto in grado di promuovere apoptosi nelle cellule di MB [3]. Un recente studio ha sottolineato un'associazione significativa tra nucleo positività per β -catenina, indice di un'attivazione aberrante del sistema WNT, e prognosi favorevole nel MB. Si tratta di una scoperta senz'altro inattesa visto il

ruolo di β -catenina nel promuovere la proliferazione dei progenitori neuronali nonché la crescita cellulare e la progressione neoplastica in alcuni tumori quali il tumore colon-rettale, l'epatocarcinoma o il carcinoma polmonare. Secondo Ellison e collaboratori, l'attivazione del signalling di WNT nel MB potrebbe influire sul bilancio tra proliferazione e morte cellulare e generare cloni di cellule neoplastiche particolarmente predisposte ad andare in apoptosi e/o più suscettibili ai trattamenti oppure potrebbe essere associata ad un fenotipo meno aggressivo [32]. È di recente acquisizione inoltre che all'attivazione aberrante del pathway WNT nel MB si associa una minore incidenza di metastasi [33].

Da questi studi emerge, in ogni caso, l'importanza del pathway WNT nel MB che, come esposto più avanti, è coinvolto anche nella sua patogenesi.

Un'altra via di segnalazione sicuramente cruciale in questo tumore è il pathway *SonicHedgehog* (SHH), anch'esso coinvolto nella patogenesi del MB. È stato ad esempio evidenziato che diversi geni bersaglio del signalling di SHH (PTCH, GLI, MYCN) risultano iperespressi nei MB desmoplastici, suggerendo una forte correlazione tra questa variante e SHH.

Come si può evincere da quanto detto fin'ora, il MB è un tumore altamente eterogeneo, sia da un punto di vista istopatologico che da un punto di vista molecolare. I markers proposti ad oggi, inoltre, trovano difficoltà ad affermarsi in ambito clinico in quanto spesso richiedono metodiche altamente specializzate che non sempre sono facilmente accessibili [33].

Al fine di "fare ordine" nella complessità e nella eterogeneità molecolare di questo tumore e per rendere la stratificazione del rischio condotta su basi molecolari più accessibile, Northcott e collaboratori hanno analizzato i profili di espressione genica di una vasta coorte di campioni di MB, giungendo alla identificazione di quattro distinti sottogruppi: WNT (gruppo A), SHH (gruppo B), gruppo C e gruppo D [33]. L'indagine è stata condotta tramite immunohistochimica, metodica decisamente più economica e ampiamente utilizzata in tutti i laboratori clinici.

Ognuno dei quattro sottogruppi molecolari proposti per il MB è quindi caratterizzato dal coinvolgimento di diversi geni e diverse vie di segnalazione, oltre che da proprietà peculiari. Si è evidenziato, ad esempio, che la quasi totalità dei MB del sottogruppo WNT appartiene alla variante istopatologica classica, mentre nel gruppo SHH si riscontra un maggior numero di MB desmoplastici.

Le metastasi sono rare nel gruppo WNT, mentre sono frequentemente riscontrate nel gruppo C. Quest'ultimo si caratterizza anche per l'amplificazione di Myc che si riscontra in tutti i MB di questo sottogruppo. Da un punto di vista istopatologico, i gruppi C e D sono comunemente associati alla variante LC/A. Questo nuovo approccio molecolare per classificare il MB potrà portare in futuro ad una prognosi più precisa e, di conseguenza, ad una cura più mirata.

Sistemi molecolari implicati nella patogenesi del MB

Il miglioramento della sensibilità prognostica del MB potrebbe aiutare da un lato a ridurre la mortalità, dall'altro a sviluppare terapie mirate che tengano conto della estrema eterogeneità del tumore.

Il raggiungimento di questi obiettivi può essere possibile anche grazie alla comprensione dettagliata della biologia del tumore, comprese le alterazioni a carico di *pathway* deregolati durante la patogenesi (Fig. 2).

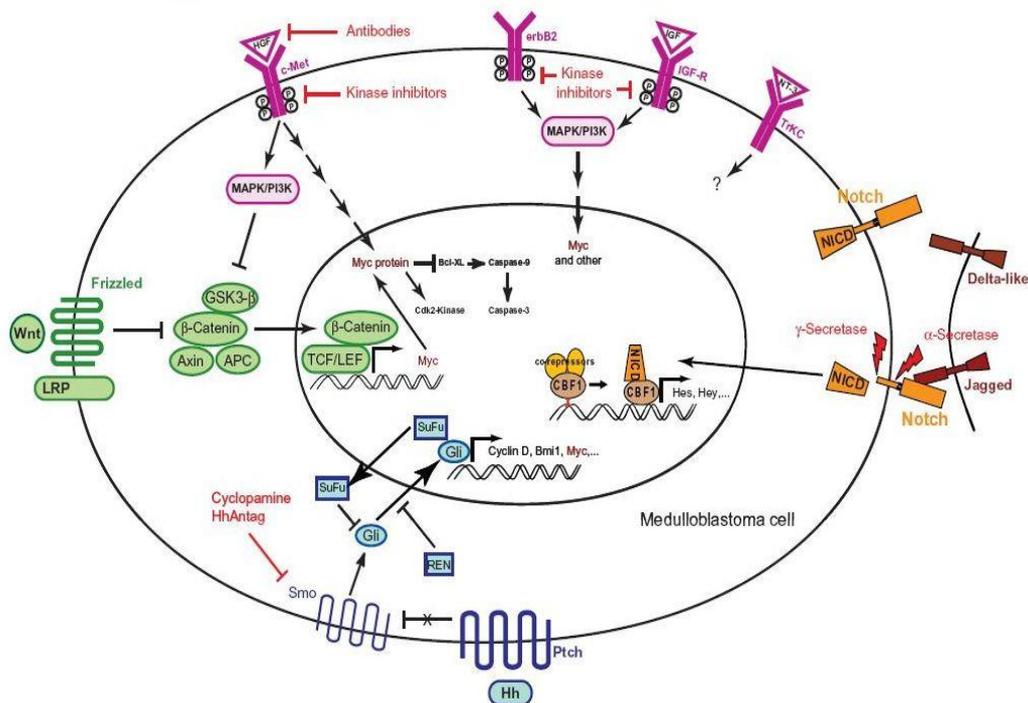


Fig. 2: Schema semplificato delle vie di segnalazione coinvolte nella patogenesi del MB. In rosa le vie che agiscono sulle MAPK (c-Met, ErbB2, IGF-R, TrkC), in arancione il pathway NOTCH, in blu la segnalazione di Sonic Hedgehog e in verde quella di WNT. Riprodotto da Guessous *et al.*, Journal of Cellular Physiology, 2008

Il pathway Sonic hedgehog (SHH)

La via di segnalazione SHH è stata implicata in forme di MB sia sporadiche che ereditarie e alla sua attivazione, come abbiamo visto in precedenza, si riconosce un sottogruppo di MB con caratteristiche peculiari.

È la via attraverso la quale gli stimoli mitotici e differenziativi arrivano a progenitori delle cellule dello strato granulare esterno del cervelletto [34]. La cascata di segnalazione è mediata da una serie di proteine, quali Patched (PTCH), Smoothened (SMOH) e il complesso multimerico (MCP) comprendente *Fused* e *Suppressor of Fused* (SUFU), ed è innescata da SHH, una glicoproteina abbondantemente secreta durante lo sviluppo cerebellare dalle cellule del Purkinje.

PTCH1, o PATCHED-1, è un recettore a 12 domini transmembrana che sopprime l'attività della proteina SMOH, una proteina G a sette eliche

transmembrana correlata alla famiglia dei recettori *Frizzled* della segnalazione WNT. La repressione della proteina SMOH fa sì che i fattori di trascrizione GLI (*glioma-associated oncogene homologue*), siano sequestrati a livello dei microtubuli da un complesso multiproteico che include *Fused* e *SUFU*. GLI1 non può funzionare da fattore trascrizionale in quanto sequestrato dal complesso; mentre GLI2 e GLI3, attivati per taglio proteolitico, assumono la funzione di repressori trascrizionali.

Il legame di SHH a PTCH1 inibisce la repressione di SMOH che nella forma attiva distrugge il complesso multiproteico *Fused-SUFU*. GLI1 viene quindi rilasciato e va ad agire nel nucleo come fattore di trascrizione, mentre l'attivazione di GLI2 e GLI3 è bloccata.

Il signalling di SHH è stato il primo ad essere implicato nella cancerogenesi umana dopo la scoperta che, mutazioni nella linea germinale a carico del gene PTCH1 causano la NBCSS (Sindrome di Gorlin) [35], una sindrome ereditaria che predispone all'insorgenza di neoplasie quali: carcinomi basocellulari, rhabdomiosarcomi e, appunto, MB [36, 37, 38].

La precisa implicazione delle mutazioni a carico dei componenti di questo pathway nella cancerogenesi del MB non è ancora chiara e attualmente oggetto di numerosi studi. Molti MB derivano dalla trasformazione di precursori cellulari dei granuli neuronali, pertanto, poiché PTCH1 è un regolatore negativo del pathway, delezioni a carico di PTCH1 in precursori di cellule neuronali potrebbero causare un processo di trasformazione maligna. Altre mutazioni riscontrate sono a carico del gene *SUFU* (in circa il 10% dei tumori), e sono generalmente alterazioni inattivanti.

Rimane da chiarire come la via di segnalazione SHH intervenga nella patogenesi del MB. Solo il 14% di topi eterozigoti per la delezione a carico di PTCH1 sviluppavano MB, sottolineando che una seconda mutazione è richiesta per lo sviluppo della neoplasia. Da altri studi su modelli murini è emerso che delezioni nel gene per p53 in un background eterozigote per la mutazione in PTCH,

aumentano notevolmente l'incidenza del MB [39]. L'aumento di incidenza della neoplasia è causato, in questo contesto, dalla perdita di funzionalità di p53 che già di per sé predispone all'insorgenza del cancro.

Il Pathway ERBB

Alla famiglia ERBB appartengono quattro membri di recettori tirosin-chinasici, ERBB1, ERBB2, ERBB3 e ERBB4. Questi recettori, quando attivati, formano degli omo o etero dimeri implicati nella risposta a stimoli mitogeni e in importanti processi cellulari quali proliferazione, apoptosi, migrazione e differenziamento[40].

L'iperespressione di questa via di segnalazione può promuovere processi di trasformazione cellulare. Nei topi, una mutazione puntiforme *gain of function*, nel dominio transmembrana di Neu (ortologo di ERBB2) causa un forte aumento della dimerizzazione del recettore e induce cancerogenesi a carico del SNC e della ghiandola mammaria.

Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che l'espressione amplificata di ERBB2 nei precursori dei granuli neuronali potrebbe portare all'insorgenza del MB. Altri studi hanno evidenziato che l'iperespressione di ERBB2 nel MB correla spesso con una prognosi sfavorevole [41, 42]. Alti livelli di espressione di ERBB2 contribuiscono alla trasformazione neoplastica attraverso la formazione di omo- ed etero- dimeri aberranti. Tale attivazione aberrante influenza la cascata delle MAPK e la via di segnalazione di Akt. Quest'ultimo, ad esempio, in seguito ad attivazione ERBB2-mediata, induce la fosforilazione di P21WAF1, un inibitore del ciclo cellulare che in questo modo viene bloccato nel citoplasma, aumentando la proliferazione cellulare.

ERBB2 ha inoltre la funzione di inibire l'apoptosi mediata da p53, interrompendo l'interazione HDM2-P14ARF [43] e di attivare la cascata angiogenetica e metastatica [44]. Alcuni di questi meccanismi potrebbero operare nel MB, poiché quando iperespresso ERBB2 forma degli omodimeri e

attiva il segnale mediato da ERK1/2 e Akt, regolando positivamente geni prometastatici in cellule di MB.

Il Pathway NOTCH

Le proteine NOTCH sono dei recettori transmembrana altamente conservati nel corso dell'evoluzione importanti nello sviluppo, proliferazione e differenziamento dei precursori cerebellari. Nel genoma dei vertebrati sono state identificate quattro isoforme del recettore NOTCH. Il legame del ligando *Jagged* ai recettori NOTCH promuove il taglio proteolitico del dominio intracellulare del recettore che migra nel nucleo e si complessa con CBF1, una proteina che lega il DNA, attivando uno specifico programma di trascrizione genica.

Rimane ancora da chiarire come questa via di segnalazione, quando deregolata, contribuisce alla cancerogenesi umana.

Ad oggi è noto che il messaggero di Notch2 è abbondantemente espresso nei MB e sembra essere associato ad una prognosi negativa.

Recenti studi riportano che topi xenotrapiantati con la linea cellulare D283MED di MB umano e trattati farmacologicamente con un inibitore del taglio proteolitico dei recettori NOTCH, mostrano una diminuzione della proliferazione tumorale e un aumento dell'apoptosi [32, 45].

Il Pathway p53/ARF

Le proteine p53 e ARF sono codificate da due oncosoppressori normalmente disattivati nei tumori umani. È noto da tempo l'importante ruolo che p53 riveste nel proteggere la cellula da danni citotossici, come l'ipossia, e genotossici (danno al DNA, attivazione di oncogeni). In questo contesto p53 è al centro di cruciali vie di segnalazioni che possono indurre l'apoptosi o l'arresto del ciclo cellulare.

I livelli endogeni di p53 sono controllati da una proteina, MDM2, con attività ubiquitino-ligasica la quale, in assenza di stress, segnala p53 per la degradazione proteosoma-dipendente. ARF interviene nell'interazione MDM2/ P53; nel caso sia necessaria l'attivazione di p53, ARF lega MDM2 impedendone il legame con p53 che migra nel nucleo dove agisce da attivatore trascrizionale [46].

Nella casistica del MB il sistema p53/ARF può riportare numerose alterazioni; delezioni di p53 nella Sindrome di Li-Fraumeni predispongono all'insorgenza del MB e l'iperespressione di questa proteina, come esposto in precedenza, è associata ad una prognosi sfavorevole della neoplasia [19]. Alterazioni del pathway sono più comuni nei MB LC/A, spesso in associazione con l'amplificazione di c-Myc.

Considerato il ruolo fondamentale di entrambe le proteine nella modulazione della chemio e radio-sensibilità, non stupisce che i MB con alterazioni a carico di questa via di segnalazione presentino una maggiore resistenza alle terapie e una prognosi infausta [47, 48].

Il Pathway WNT

Il pathway Wnt/ β -catenina (*The Wingless Pathway*) controlla numerosi processi cellulari, compresi quelli implicati nello sviluppo, nella proliferazione e nel differenziamento neuronale. L'attivazione aberrante di questa via di segnalazione è implicata in molti processi di oncogenesi umana.

Mutazioni in proteine coinvolte in questo pathway sono state individuate, in circa il 15% dei MB [49] sporadici e, quando trasmesse dalla linea germinale, sono responsabili dell'insorgenza di forme ereditarie della malattia [6]. Nel 25% dei casi si ha mutazione direttamente del gene CTNNB-1, il gene di β -catenina, proteina chiave del pathway.

In condizioni fisiologiche la concentrazione citoplasmatica di questa proteina è controllata da un complesso multiproteico di degradazione che include la proteina *scaffold* axina, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) e la glicogeno

sintasi chinasi 3 β (Gsk3 β). Gsk3 β , in questo contesto svolge un duplice ruolo: da un lato fosforila APC e axina, aumentandone l'affinità per residui funzionali di β -catenina; dall'altro iperfosforila β -catenina stessa, inducendone la degradazione (Fig. 3).

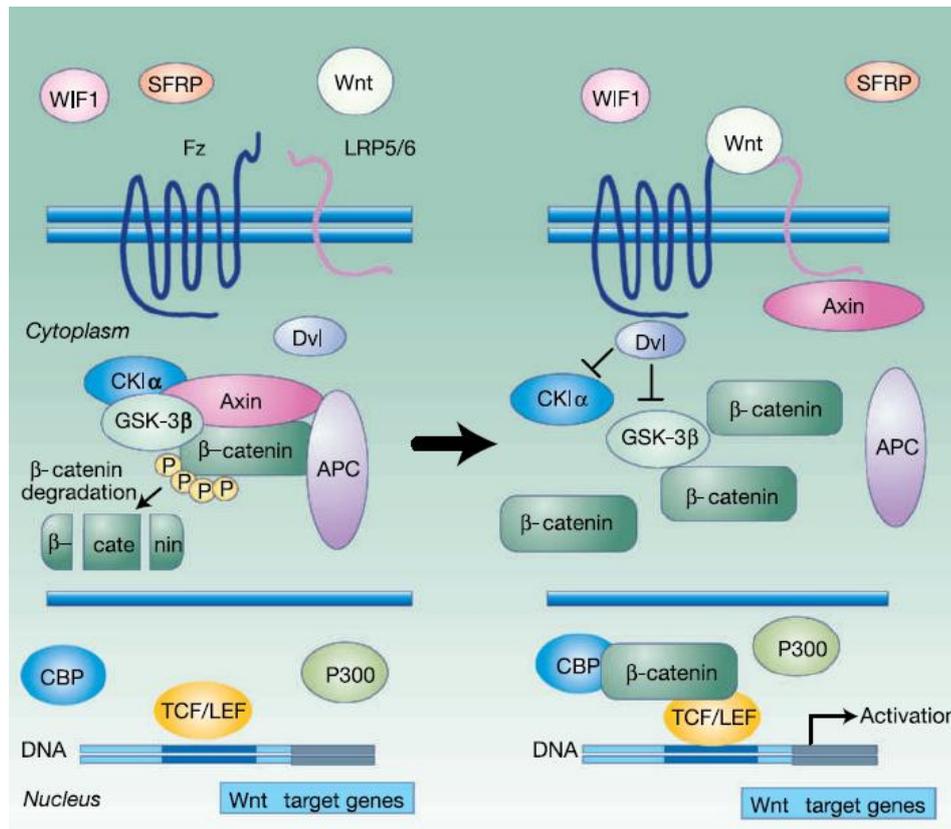


Fig. 3. Pathway WNT canonico. Il complesso proteico di degradazione, costituito principalmente da Gsk-3 β , APC e axina, lega β -catenina in assenza di segnalazione WNT, promuovendo la degradazione della proteina da parte del proteosoma. Quando WNT si lega al recettore *Frizzle* e al co-recettore LRP5/6, promuove una segnalazione cellulare che inibisce il complesso di degradazione, β -catenina ipofosforilata si accumula nel citoplasma e migra nel nucleo, dove, legandosi a TCF/LEF, promuove la trascrizione di una serie di geni *targets*

L'attivazione della via di segnalazione WNT è dovuta al legame di ligandi della famiglia WNT a recettori *Frizzled*. Questi ultimi sono recettori a sette eliche transmembrana, responsabili dell'interazione con il ligando.

L'interazione recettore-ligando richiede la presenza di un corecettore LRP (*LDL related protein*) necessario per la formazione del complesso ternario WNT/Fzl/LRP [50] che promuove l'inizio della trasduzione del segnale.

Successivamente LRP fosforilato in Ser/Thr dalla chinasi I γ (CKI γ) e da Gsk3 β lega axina sequestrandola a livello della membrana plasmatica, inattivandola e inviandola a degradazione [51].

Allo stesso tempo viene indotta la fosforilazione di *Dishevelled* (Dlv) che fosforilata interagisce con axina e inattiva Gsk3 β .

Questi eventi inducono una ipofosforilazione di β -catenina che non viene pi \dot{u} degradata, si accumula nel citosol e migra nel nucleo dove si lega ai fattori di trascrizione TCF/LEF e trasattiva cos \grave{u} numerosi geni bersaglio, la maggior parte dei quali sono classificati come oncogeni, in quanto, se *over-espressi*, promuovono tumorigenesi. Alcuni di questi geni sono importanti per la progressione della cellula nel ciclo cellulare, come c-Myc e la ciclica D1, altri intervengono nel processo apoptotico, come il gene per la survivina, o nella progressione metastatica del tumore, come laminin γ 2 e mmp7 (*matrix metalloproteinase-7*) [50, 52].

Come accennato ad inizio paragrafo, una parte consistente delle mutazioni del pathway WNT riportate nei MB sporadici, interessano il gene CTNNB1; sono spesso mutazioni missenso che portano alla sostituzione di residui di serina e treonina in domini proteici in cui questi amminoacidi sono particolarmente abbondanti (Ser²⁹-Lys⁴⁹). Queste mutazioni prevengono la degradazione fosforilazione-dipendente di β -catenina da parte di GSK3 β . I livelli di β -catenina aumentano in maniera incontrollata nel citosol e attivano costitutivamente tutti gli oncogeni a valle della via di segnalazione. Altri eventi di mutazione sono a carico dei geni per l'axina e per APC. Il gene che codifica per APC \grave{e} spesso sede di importanti delezioni, in risposta alle quali viene sintetizzata una proteina tronca e mancante del dominio di interazione con l'axina [53, 54, 55]. Mutazioni a

carico del gene per APC sono anche responsabili della Sindrome di Turcot, una sindrome che predispone all'insorgenza del MB e di tumori intestinali .

La radioterapia nel Medulloblastoma

Aspetti generali

La radioterapia è una componente chiave dei moderni regimi terapeutici anti-neoplastici. Il suo utilizzo comporta però gravi effetti collaterali, dovuti essenzialmente alla impossibilità di colpire esclusivamente il tumore lasciando intatto il tessuto sano. Un altro grosso problema è rappresentato dalla radioresistenza intrinseca di alcuni tumori. Nel MB un terzo dei pazienti manifesta resistenza alla radioterapia. L'implementazione delle conoscenze sui meccanismi molecolari alla base della risposta cellulare al danno indotto dalle radiazioni e una maggiore conoscenza di marker tumorali, potrebbe portare in futuro ad una cura mirata a rendere le cellule neoplastiche più radiosensibili, consentendo l'utilizzo di protocolli terapeutici meno invasivi.

Le radiazioni ionizzanti (RI), utilizzate in terapia, agiscono attivando essenzialmente diversi meccanismi molecolari di soppressione della crescita tumorale: arresto del ciclo cellulare, induzione della senescenza, apoptosi, e catastrofe mitotica.

Le RI sono radiazioni corpuscolate (come particelle α , β cariche elettricamente, neutroni, protoni, nuclei di Elio e Carbonio) o non corpuscolate (fotoni che viaggiano nello spazio sotto forma di onde elettromagnetiche come i raggi X e γ) in grado di produrre ioni, direttamente o indirettamente, passando attraverso la materia e di rilasciare in questo passaggio pacchetti di energia. Gli effetti che si producono possono essere dovuti ad una "azione diretta" su substrati solidi (ad esempio danno diretto al DNA) o ad una "azione indiretta", per mezzo cioè dei prodotti derivati dalla radiolisi dell'acqua.

La grandezza fondamentale, nel settore delle RI, è la dose assorbita, definita come l'energia assorbita per unità di massa e misurata in Gray (Gy):

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ joule di energia assorbita da un chilogrammo di materia}$$

La probabilità di danno, tuttavia, non dipende soltanto dalla dose assorbita ma anche dalla qualità della radiazione: per questo aspetto si fa riferimento ad una particolare grandezza fisica, il *Linear Energy Transfer* (LET), che esprime l'energia ceduta dalla radiazione per unità di percorso nel mezzo assorbitore (si misura in Kev/ μm). Una radiazione ad alto LET cede notevoli quantità di energia in un breve percorso, presenta un maggior effetto biologico ed una minima capacità di penetrare i tessuti (poiché perde la sua energia in distanze ridotte); proprietà opposte hanno le radiazioni a basso LET.

Particelle ad alto LET (come particelle α , β e i neutroni) sono più dannose, per unità di dose, che le radiazioni a basso LET (come raggi X e γ).

Il bersaglio principale delle RI in ogni caso è costituito dal DNA, il che giustifica il loro potere mutageno e cancerogeno. Il danno al DNA consiste essenzialmente in rotture al singolo (*Single-Strand Breaks*, SSB) o al doppio filamento (*Double-Strand Breaks*, DSB) dello scheletro zucchero-fosfato. Le RI inducono inoltre *crosslink* tra i filamenti di DNA e le proteine associate ai cromosomi e danni alle membrane cellulari. [56]

I DSBs rappresentano il principale tipo di lesione e se non adeguatamente riparate portano a morte cellulare per formazione di aberrazioni cromosomiche letali o per induzione diretta di apoptosi. D'altra parte, il non riparo o un riparo inadeguato dei DSBs può portare a mutazioni o riarrangiamenti genomici nelle cellule sopravvissute e quindi a instabilità genetica e probabile trasformazione maligna [57].

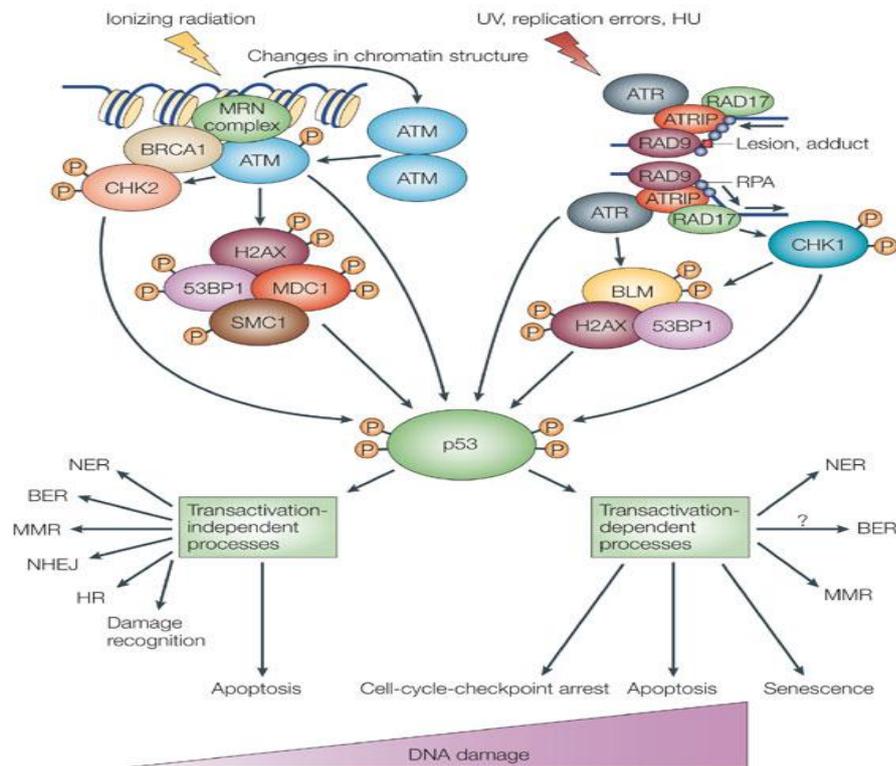
Le RI hanno un'elevata capacità di uccidere le cellule tumorali, ma la dose che può essere effettivamente utilizzata nel trattamento del paziente è vincolata alla necessità di limitare il più possibile i danni ai tessuti sani circostanti il tumore. Per questo motivo, generalmente, in clinica si utilizzano frazioni multiple

erogate alla sede tumorale. Il frazionamento delle dosi aumenta significativamente l'effetto antitumorale rispetto alla singola applicazione poiché permette di raggiungere dosi cumulative più elevate di RI, limitando i danni ai tessuti sani.

Risposta biologica alle radiazioni ionizzanti (RI)

La presenza di RI ha accompagnato gli organismi nell'evoluzione, portando allo sviluppo di numerosi meccanismi difensivi. Se negli organismi unicellulari la risposta al danno al DNA dipende esclusivamente dalla sua capacità di arrestarsi ad uno dei vari *checkpoints* del ciclo cellulare per un tempo sufficiente al riparo della rottura, negli organismi multicellulari la risposta alle RI è complicata dal fatto che esse colpiscono l'organismo intero. Di importanza cruciale è quindi la sopravvivenza delle cellule staminali, in grado di rigenerare il tessuto danneggiato, piuttosto che quelle già differenziate. Bisogna comunque considerare che la sopravvivenza delle cellule differenziate, nelle quali il danno non sia stato riparato, potrebbe promuovere un processo tumorigenico per accumulo di mutazioni nella progenie cellulare.

L'evoluzione ha conservato gli antichi meccanismi di risposta al danno genotossico, ossia l'attivazione dei meccanismi di riparo al DNA accoppiati all'arresto del ciclo cellulare, presenti in tutti gli eucarioti.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Fig. 4. Pathway molecolari attivati nella cellula in risposta a danni citotossici indotti da radiazioni ionizzanti o stress replicativo

A coordinare questo processo è il noto oncosoppressore, p53, denominato anche “guardiano del genoma” in quanto ha il compito di assicurare, in seguito a stress genotossici di varia natura, l’integrità del materiale genetico (Fig. 4).

I *networks* molecolari che portano alla risposta al danno al DNA indotto da RI coinvolgono sensori, mediatori, trasduttori ed effettori. Le “proteine sensori” del danno si sono conservate nel corso dell’evoluzione dal lievito ai mammiferi e sono: Rad9, Rad1, Hus1 e Rad17 [58]. Rad9, Rad1, Hus1 formano un eterodimero, il complesso 9-1-1, mentre Rad 17 si complessa a 4 piccoli fattori di replicazione (*Replication Factor C*, Rfc) Rfc2, Rfc3, Rfc4 e Rfc5.

Il reclutamento di tutte le proteine coinvolte nella risposta al danno dipende dalla fosforilazione dell’istone γ H2AX da parte di ATM (*Ataxia Telangiectasia*

Mutated), che marca regioni di cromatina che si estendono per alcuni kDA a partire dalla lesione del DNA [59, 60].

In assenza di stress genotossico ATM esiste come omodimero in cui i domini chinasi sono bloccati dall'interazione tra le due subunità. Il danno al DNA provoca la fosforilazione di un residuo di serina su ciascun monomero e la dissociazione del dimero stesso, che promuovono un cambiamento conformazionale della cromatina.

Un'altra proteina che partecipa alla risposta al danno al DNA è ATR, una chinasi che, a differenza di ATM, è costitutivamente pronta a fosforilare i suoi substrati.

L'importanza di ATR la si può intuire dal fatto che topi *knockout* per questa proteina mostrano letalità embrionale e dal fatto che l'espressione di un dominante negativo della proteina rende le cellule di mammifero più sensibili a qualsiasi insulto genotossico. Sia ATM che ATR esercitano la loro attività chinasica su proteine che promuovono l'arresto della cellula ai vari *checkpoint* del ciclo cellulare come Chk1 (*checkpoint kinase 1*) e Chk2 (*checkpoint kinase 2*), due serin- treonin chinasi con strutture diverse ma con molti substrati in comune [61].

Come già accennato, il tipo di risposta cellulare alle RI dipende dalla proteina p53, un transattivatore trascrizionale e dal *pool* di geni bersaglio di questa che, al momento del danno, sono in una regione della cromatina trascrizionalmente attiva (eucromatina). In assenza di danno, come precedentemente anticipato, i livelli intracellulari di p53 sono regolati dall'interazione con MDM2 [62], una proteina con attività ubiquitino-ligasica, che induce p53 a degradazione. In caso di danno genotossico p53 viene fosforilata da ATM e ATR. La fosforilazione la sottrae all'interazione con MDM2, attivandola; parallelamente ATM fosforila MDM2 riducendone la capacità di trasportare p53 dal nucleo al citoplasma [63].

In ogni caso quello che emerge è la centralità di ATM nella risposta al danno al DNA, in particolare in risposta ai DSBs che come abbiamo esposto

costituiscono il tipo di lesione causato principalmente dalle RI utilizzate in terapia e che sono particolarmente letali per la cellula. ATM nella risposta ai DSB è il trasduttore primario del segnale.

I meccanismi di riparazione dei DSBs

Sarebbe sbagliato pensare che i meccanismi di riparo dei DSBs si attivano solo a seguito di un danno genotossico esterno. Si può infatti tranquillamente affermare che i meccanismi di riparo della doppia elica mantengono un'attività ridotta ma continua, per assicurare che la cellula mantenga costantemente il suo stato normale. Eventi rischiosi per la formazione dei DSBs possono essere ad esempio la ricombinazione meiotica o l'assemblaggio delle immunoglobuline nei linfociti.

La riparazione delle rotture a doppia elica è effettuata attraverso due diversi meccanismi: un meccanismo rapido, con possibilità di errore, chiamato '*non-homologous end-joining*' (NHEJ) che sigilla rapidamente le rotture senza tener conto dei frammenti omologhi, ed un processo di riparazione ad alta fedeltà ("*Homologous-recombination*", HR) tra cromatidi fratelli [64] che risulta però decisamente più lento (Fig. 5).

Questi processi si basano sull'azione combinata di diversi complessi multiproteici.

Homologous recombination (HR)

La via di riparazione ad alta fedeltà basata sulla ricombinazione omologa delle estremità è mediata da RAD51 e da altri fattori associati ad essa quali RAD52, l'elicasi RAD54 e il soppressore di tumori "*Breast cancer susceptibility protein*", BRCA [65]. Dopo che RAD52 ha tagliato e saldato le estremità a singola elica, RAD51 forma un filamento di nucleoproteine sull'elica esposta. Questo processo consente l'uso della molecola del cromatidio fratello non

danneggiata come stampo per una nuova sintesi delle porzioni mancanti nella molecola rotta.

Il complesso MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) sembra essere essenziale per l'HR [66], un complesso che interviene nel processamento iniziale delle estremità della lesione ed è coinvolto nella ricombinazione meiotica, nella manutenzione dei telomeri e nella segnalazione dei *checkpoints* cellulari. In seguito alla formazione dei DSBs, il complesso MRN forma rapidamente dei foci nei siti danneggiati. Questi foci includono altri componenti della risposta al danno, come RAD51 e BRCA1. MRE11 è una nucleasi, RAD50 è una ATPasi e la proteina NBS1, essenziale per l'assemblaggio del complesso, interagisce con l'istone H2AX.

Non-homologous end-joining (NHEJ)

Il principale meccanismo di riparazione nelle cellule dei mammiferi è comunque il NHEJ, in quanto è il primo meccanismo ad attivarsi e assicura una seppur minima stabilità genomica alla cellula che deve affrontare un forte danno genotossico.

Le terminazioni esposte della catena del DNA danneggiato sono come dei segnali per l'eterodimero KU70-KU80 che recluta la subunità catalitica della proteina chinasi DNA-dipendente (DNA-PKcs). La DNA-PKcs, a sua volta, recluta proteine supplementari verso il sito danneggiato e probabilmente ne fosforila alcune. Infine l'eterodimero della ligasi IV XRCC4 sigilla le rotture.

Nonostante lo svantaggio della sua bassa fedeltà, questa via di riparazione agisce rapidamente, come è richiesto da un meccanismo d'emergenza e, diversamente dall'HR, non dipende dalle molecole di DNA del cromatidio fratello, che si trovano nelle cellule solo dopo la replicazione del DNA.

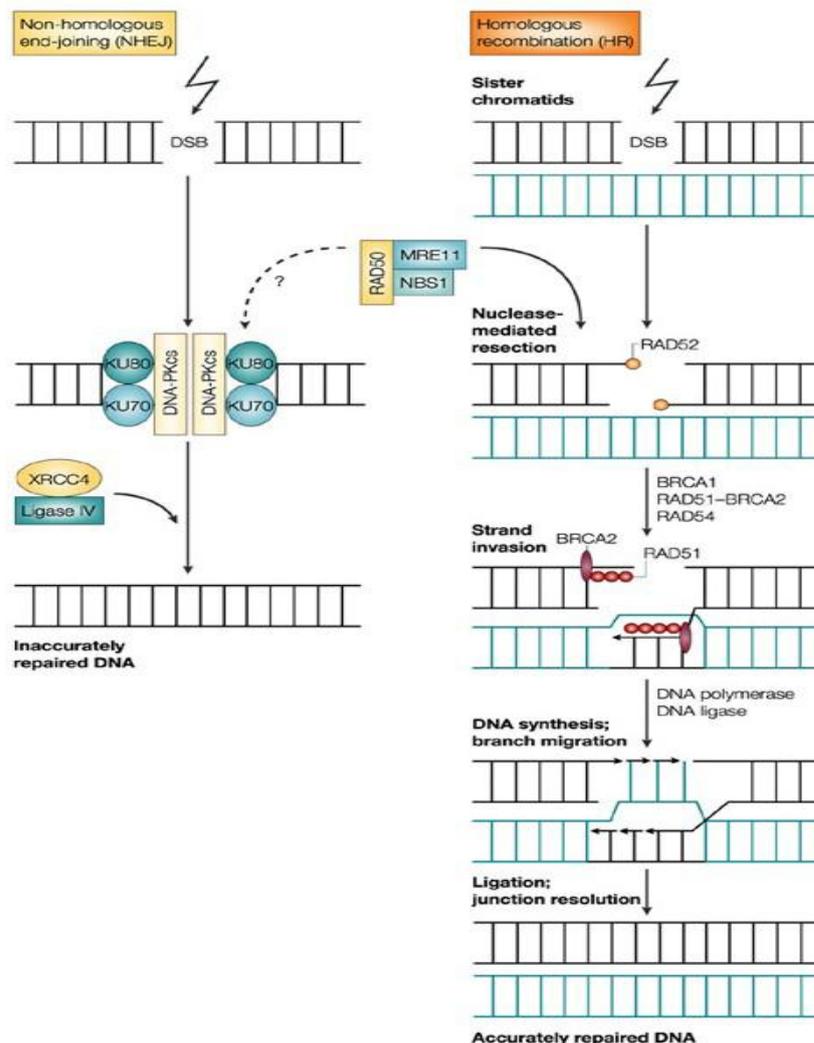


Fig. 5. Schema riassuntivo dei due principali meccanismi molecolari di risposta al danno genotossico: l’NHEJ a sinistra, più rapido ma meno specifico; l’HR a destra, più complesso, più lento ma più specifico in quanto sfrutta come stampo le due estremità complementari di DNA

Radioterapia e Medulloblastoma

Il MB è un tumore particolarmente radiosensibile; l’*iter* terapeutico prevede l’asportazione chirurgica della massa tumorale seguita da radioterapia dell’intero neurasse [9, 14, 67]. La radioterapia è il trattamento di elezione per la cura di questa neoplasia in fase post-operatoria. Questa, tuttavia, comporta gravi effetti collaterali neuroendocrini e cognitivi a lungo termine, in particolare nei bambini di età inferiore agli otto anni.

Al fine di limitare gli effetti collaterali, in America le dosi di radioterapia sono state ridotte da 36.0 Gy a 23.4 Gy. La somministrazione di chemioterapia adiuvante ha permesso di ridurre le dosi radioterapiche senza ripercussioni sul numero dei lungo sopravvissuti [15, 68]. Tuttavia anche la dose ridotta di 23,4 Gy rimane associata ad effetti neurologici tossici, specialmente in bambini di età inferiore agli otto anni [5].

Recenti studi sono rivolti a comprendere le conseguenze sulla prognosi della malattia, in pazienti con rischio medio ed età compresa tra i 3 e gli 8 anni, di un'ulteriore riduzione della dose radioterapica a 18.0 Gy. Anche in Europa i pazienti a medio rischio sono trattati attualmente con chemioterapia e radioterapia post-operatoria, sebbene le dosi radioterapiche non siano ancora state ridotte. Un innovativo regime terapeutico, il *sandwich therapy*, è in fase di studio e prevede la somministrazione di chemioterapia prima e dopo le radiazioni [69, 70, 71, 72].

Si è osservato che in pazienti con rischio medio la co-somministrazione di chemio e radioterapia post-chirurgica risulta più efficace che la sola radioterapia. In meno del 50% dei casi, pazienti con MB ad alto rischio possono avere una sopravvivenza a 5 anni libera da progressione [73, 74].

Prospettive future in radioterapia

Nuove possibilità, per una cura più mirata e che comporti meno effetti collaterali, provengono dalla ricerca scientifica. La conoscenza dei meccanismi molecolari alla base della tumorigenesi e della resistenza ai trattamenti permetterà lo sviluppo di nuovi farmaci in grado di aggredire selettivamente il tumore oppure di co-adiuvare le attuali terapie, rendendole più efficaci o meno invasive. Questo nuovo approccio prende il nome di “*Target therapy*” che verrà esposta in dettaglio nel capitolo successivo.

Una parte consistente di questa ricerca è anche rivolta alla possibilità di ridurre gli effetti collaterali associati alle RI, cercando di aumentare la radiosensibilità

del tumore o cercando di abbatterne la radioresistenza. Questo aspetto può essere particolarmente interessante in un tumore come il MB che presenta radioresistenza intrinseca in un terzo dei casi e che colpisce prevalentemente i bambini.

Target therapy

Buona parte della ricerca farmacologica oggi, in particolar modo quella oncologica, si pone come obiettivo la realizzazione del comunemente detto “proiettile magico”, ovvero di un farmaco, di una molecola, o più in generale di una strategia che possa essere talmente selettiva per la malattia da non causare danno ai tessuti sani e rendere così nulli gli effetti collaterali associati ad ogni genere di cura.

L’idea del proiettile magico, posta in questi termini, è ovviamente utopia; ma l’idea di migliorare le terapie attuali al fine di renderle più specifiche e di limitare gli effetti collaterali è alla base di gran parte della ricerca attuale, soprattutto in un ambito, come quello della ricerca sul cancro, dove chemi- o e radio- terapia hanno spesso conseguenze devastanti sui tessuti sani.

In questo ambito si inserisce la *target therapy*, appunto “terapia mirata”. Generalizzando, si possono considerare tre importanti approcci diversi in target therapy [75]:

- *Antibody-targeted therapy*,
- *Small molecole*,
- *Ligand-mediated therapy*.

Antibody-targeted therapy

Risale al 1975 lo sviluppo di tecniche che hanno reso possibile la produzione di grandi quantità di anticorpi in grado di legarsi ad antigeni specifici. Questo ha ovviamente facilitato la ricerca sul possibile impiego clinico di questi composti [76].

L'utilizzo di anticorpi in una cura mirata contro il cancro comporta dei vantaggi considerevoli, come la grande capacità e specificità nel legarsi ad un particolare bersaglio e la buona tolleranza dell'organismo. Alcuni di essi infatti sono già stati riconosciuti e approvati negli USA dalla FDA e quindi sono già ampiamente utilizzati in clinica [75].

Generalmente questi anticorpi vengono sintetizzati affinché abbiano come target vie di segnalazione coinvolte nella proliferazione cellulare o nei meccanismi apoptotici; ma un'altra opportunità connessa al loro utilizzo sta nella possibilità di legare ad essi altre sostanze (tossine, chemioterapici, piccole molecole) che svolgano la loro funzione terapeutica *in loco*, minimizzando gli effetti collaterali dovuti all'utilizzo sistemico di questi composti. In questo caso l'anticorpo è solo un vettore in grado di portare sostanze tossiche sul sito bersaglio. Questo approccio però può essere utilizzato solo nel caso in cui si riconosca un marker specifico per il tumore che non si riscontri invece sulle cellule sane. Questo aspetto limita di molto le potenzialità terapeutiche della metodica: ad oggi, infatti, non sono stati ancora individuati markers specifici ed esclusivi per ogni tipo di tumore.

Un'altra problematica legata all'utilizzo su larga scala degli anticorpi in ambito clinico è che essi non sono di origine umana, ma principalmente murina, quindi è necessario un processo di ingegnerizzazione che renda gli anticorpi ben tollerati dall'uomo e dal nostro sistema immunitario. Un procedimento che può essere complesso e dispendioso.

Ligand-mediated therapy

Come accennato più volte, il problema principale delle attuali terapie oncologiche è la loro aspecificità. Gli effetti collaterali che si riscontrano sono essenzialmente dovuti a questo e l'unico approccio possibile per ridurre la tossicità dei trattamenti risulta quello di ridurre le dosi dei chemioterapici o frazionare le dosi di RI, aumentando però il rischio che la terapia non sia più

efficace. L'idea di una "ligand therapy" è proprio quella di garantire dosi ottimali di farmaci, o addirittura maggiori di quelle attuali, senza che ciò comporti grossi effetti avversi. Questo può essere possibile tramite dei vettori, ad esempio dei sistemi liposomiali, che liberino il loro contenuto tossico solo in prossimità delle cellule tumorali. Anche in questo caso il maggior ostacolo, come per gli anticorpi, è quello di trovare target sulla superficie delle cellule cancerose che non si riscontrino sulle cellule sane.

Small molecule

La crescente comprensione degli eventi molecolari alla base dell'eziologia dei diversi tumori, e la comprensione dei diversi signalling cruciali per la continua crescita e proliferazione delle cellule tumorali, sono alla base di questo nuovo tipo di approccio terapeutico. Le "small molecule" sono appunto dei composti dal piccolo peso molecolare (inferiore agli 800 Da), generalmente lipofili, in grado di legarsi molto specificamente a proteine, recettori ed enzimi fondamentali per le cellule cancerose. La loro dimensione ridotta e la natura per lo più lipidica fanno sì che queste molecole raggiungano rapidamente il loro bersaglio cellulare. L'obiettivo principale in una target therapy che voglia sfruttare l'attività inibitoria di piccole molecole non è certo quello di sostituire gli attuali protocolli chemio e radio terapeutici, ma piuttosto quello di migliorarne il rendimento e l'esito.

Moltissimi studi, infatti, esplorano la possibilità di combinare la radioterapia e la chemioterapia con specifiche molecole inibitorie dei meccanismi di riparo del DNA. Da questo punto di vista, negli anni è cresciuto l'interesse per i membri della super-famiglia delle PARP (*Poli ADP-Ribosio Polimerase*), proteine estremamente coinvolte nelle dinamiche di riparo del DNA.

Un membro della famiglia delle PARP come possibile bersaglio terapeutico: Tanchirasi

La famiglia delle PARP

Nell'uomo la famiglia delle proteine PARP comprende almeno 18 membri. La funzione e la struttura di ognuno di essi non è ancora del tutto nota, ma per almeno cinque di loro sono state studiate le proprietà biochimiche ed enzimatiche: PARP-1 (113 kDa), PARP-2 (62 kDa), PARP-3 (60 kDa), PARP-4 (193 kDa), e PARP-5 o Tanchirasi (142 kDa). Ad oggi, quello maggiormente studiato è PARP-1, un abbondante enzima nucleare coinvolto nella risposta cellulare al danno al DNA provocato da stress genotossico [77].

L'attività catalitica di questi enzimi si esplica mediante molecole di Nicotinammide-Dinucleotide (NAD⁺) che permettono l'aggiunta, attraverso legami covalenti, di polimeri di ADP-ribosio su specifiche proteine bersaglio. Questa modificazione prende il nome di *parsilazione*.

La parsilazione è una modificazione post-traduzionale di proteine nucleari e citosoliche coinvolte nella regolazione di importanti processi fisiologici, come il mantenimento dell'integrità genomica, la replicazione, la trascrizione del DNA e la morte cellulare. Tale attività polimerasica è stata identificata in molti organismi eucarioti, dai funghi ai mammiferi (eccetto i lieviti *S. cerevisiae* e *S. pombe*) ma anche in archeobatteri, eubatteri e virus a DNA doppio filamento [78].

Da un punto di vista clinico, il ruolo cruciale svolto da queste proteine nei meccanismi di riparo del DNA ne fa degli ottimi target molecolari per una cura mirata ad aumentare l'efficacia delle attuali terapie contro il cancro.

Mentre PARP-1 è, come detto, il membro della famiglia più studiato (alcuni inibitori di questo enzima sono già entrati in studi di fase III), la rilevanza

clinica della PARP-5 Tankyrase (TNKS) è stata messa in luce solo di recente e verrà esposta approfonditamente dei paragrafi successivi.

Tanchirasi

Generalità

Ci sono due geni diversi nel genoma umano e murino che specificano per due isoforme dell'enzima, TNKS1 e TNKS2. Esperimenti di *gene knockout* condotti nel topo, hanno dimostrato una ridondanza funzionale tra le due proteine: la soppressione mediante *knockout* di una sola copia del gene non dava alcuna manifestazione fenotipica nei topi, mentre il *double knockout* mostrava letalità embrionale a dieci giorni [79].

L'analisi della struttura primaria di TNKS1 rivela la presenza di quattro domini distinti: un dominio amminotermineale ricco in istidina, prolina e serina, noto anche come HSP, dalle iniziali dei tre aminoacidi; un *ankirin domain*, composto da 24 ripetizioni ANK; un dominio SAM (*sterile alpha module*) e un dominio catalitico carbossi-terminale o *PARP domain* [*poly(ADP- ribose) polimerase domain*].

A seguito dell'identificazione di TNKS1, uno “screening del doppio ibrido” ha portato all'individuazione del suo omologo, TNKS2 che differisce da TNKS1 per la mancanza del dominio HSP [80]. Entrambe le proteine sono implicate in numerose interazioni proteina-proteina. Il dominio ANK è composto da ben cinque sottodomini [81, 82], ognuno dei quali lavora come sito di interazione indipendente con diversi partner proteici. Ognuno di questi può inoltre fornire un sito di interazione discreto con molecole di TRF1. Il dominio SAM invece è implicato nell'omo- e nell'etero- multimerizzazione di TNKS [81, 83, 84]. La presenza di siti di interazione *in tandem* e la capacità di multimerizzazione della proteina portano alla formazione di complesse strutture sopramolecolari, altamente ordinate, che fungono da *scaffold* per tutti i *partners* di interazione [81, 82, 84].

L'importanza di TNKS1 nella cellule è data anche dal fatto che è un enzima altamente conservato nel corso dell'evoluzione e in tutti gli eucarioti. Geni omologhi per la proteina sono stati ritrovati in molti organismi eucarioti: protozoi (ciliati e amebe); invertebrati (insetti, vermi e tunicati); vertebrati (mammiferi, uccelli, anfibi e pesci), ma sorprendentemente sono assenti nel regno vegetale e nei funghi.

Più in particolare, analisi strutturali di TNKS1 hanno indicato che i domini ANK, SAM e PARP si sono altamente conservati in tutte le TNKS dei vertebrati, mentre il dominio HSP è assente negli invertebrati e nei protozoi.

L'omologo TNKS2 è presente nell'uomo, nel topo e nel pollo ma non in altri organismi. L'alta omologia di sequenza tra TNKS1 e TNKS2 e la presenza, in molti organismi, di una sola delle due isoforme, portano a credere ad una ridondanza funzionale tra le due proteine. Entrambe sono ubiquitariamente espresse in molti tessuti umani e linee cellulari, benché TNKS1 sia più presente in tessuti germinali, quali testicoli e ovaie [80, 85, 86].

Interazioni funzionali di Tanchirasi

La scoperta di TNKS si deve alla sua interazione con il *Telomeric Repeat Factor 1*, o TRF1, una proteina che maschera i telomeri impedendo l'attività di elongazione delle telomerasi. L'interazione funzionale tra le due proteine è stabilita tra un dominio amminoacidico terminale di TRF1 e il dominio ANK di TNKS.

Nel corso del ciclo cellulare, TNKS si sposta in vari compartimenti biologici: cellule HeLa, marcate con un anticorpo che riconosce il dominio HSP di TNKS1, mostrano una localizzazione telomerica dell'enzima durante la prometafase [86].

Durante l'interfase TNKS ha invece una localizzazione citoplasmatica; tuttavia può essere reclutata a livello dei telomeri da TRF1. TNKS manca di un segnale di localizzazione nucleare, ma se cotrasfettata con TRF1 è reclutata a livello

nucleare; pertanto TRF1 è necessario per richiamare e stabilizzare TNKS nel nucleo [87].

TNKS1 parsila TRF1 promuovendone il distacco dalle sequenze telomeriche. Infatti, un'iper-espressione indotta di TNKS1 nel nucleo di cellule umane, comporta la rimozione di TRF1 dai telomeri [86, 88] e la sua successiva ubiquitinazione e degradazione mediata dal proteosoma [89]. Mutazioni LOF (*Loss Of Function*) di TRF1, al pari di un'iper-espressione a lungo termine di TNKS1, comportano un allungamento dei telomeri ad opera delle telomerasi. Questi dati concordano nell'attribuire a TNKS1 un ruolo di regolatore positivo della lunghezza telomerica [86, 88].

TNKS1 è implicata anche nella risoluzione di chiasmi che si formano tra cromatidi fratelli durante la metafase. I cromatidi fratelli rimangono strettamente associati fino alla arrivo del segnale che promuove l'ingresso della cellula in anafase; l'associazione è mediata da proteine della famiglia delle coesine [90, 91]. Nei vertebrati, la segregazione dei cromatidi alla mitosi è controllata da due diversi *pathway*, uno che agisce a livello dei centromeri e l'altro che agisce sui bracci dei due cromosomi. Recenti evidenze attribuiscono a TNK un ruolo fondamentale nelle dinamiche della segregazione; esperimenti di *knockdown* su TNKS causano arresto mitotico [92].

TNKS è coinvolta inoltre nell'interazione con un apparato proteico nucleare/mitotico (NuMA) [93] che può trovarsi in due compartimenti diversi durante il ciclo cellulare: nella matrice nucleare, durante l'interfase, e nel fuso mitotico, durante la mitosi. NuMA interviene nel processo di assemblaggio dei poli del fuso mitotico, in cui è richiesto per l'organizzazione dei microtubuli [90, 94]. TNKS1, endogena, colocalizza con NuMA a livello dei poli del fuso, dalla profase all'anafase [87, 95]. La localizzazione di TNKS dipende dalla presenza di NuMA, infatti la deplezione di NuMA mediante *RNA interference* comporta la scomparsa di TNKS1 dai poli. TNKS1 parsila NuMA sia *in vitro* che *in vivo* e il silenziamento di questa promuove la comparsa di difetti fenotipici del fuso

mitotico, a conferma di un ruolo importante di TNKS1 in questa successione di eventi [95, 96].

TNKS interagisce anche con una proteina integrale di membrana, IRAP (*insulin responsive amino peptidase*), una peptidasi attivata da stimoli insulinici [97].

IRAP è inserita nella membrana di vescicole per il trasporto di glucosio, GLUT4, ritrovate in tutti i tessuti insulino sensibili, come adipociti e miociti [98]. Queste vescicole vengono sequestrate nel reticolo del Golgi e traslocate, in risposta a stimoli insulinici, a livello della membrana cellulare in modo da facilitare l'*uptake* del glucosio.

Un altro importante ruolo di TNKS, messo in luce solo nel 2009, è quello di regolare positivamente il pathway WNT/ β -catenina, mediante parsilazione di axina, una proteina del complesso di degradazione di β -catenina. Questa specifica interazione verrà spiegata più approfonditamente in seguito [99].

Tra le varie interazioni funzionali attribuite a TNKS, la più recente e interessante è quella con la DNA-PKcs (subunità catalitica del complesso protein chinasi DNA dipendente), un enzima implicato, come descritto precedentemente, nel riparo dei DSBs da parte del sistema NHEJ.

La deplezione di TNKS, mediante *knockout* genico o l'inibizione farmacologica dell'enzima mediante una specifica small molecule, ha lo stesso effetto di una deplezione della DNA-PKcs: rende le cellule incapaci di riparare i DSBs indotti da agenti genotossici quali le RI [100].

Tanchirasi e DNA-PKcs nella radiosensibilità cellulare

La DNA-PKcs è una serin-treonin chinasi e la sua attività catalitica aumenta in presenza di DNA e Ku; fosforila normalmente i suoi target in residui di serina e treonina seguiti da residui di glutammina come tutte le proteine della famiglia PIKK (*phosphoinositide 3 - Kinase like family of protein Kinases*), alla quale appartiene. Cellule trattate con inibitori dell'attività chinasi di questa proteina risultano particolarmente radiosensibili, facendo di DNA-PKcs un potenziale

target terapeutico nel trattamento di tumori considerati radioresponsivi.

L'attivazione di DNA-PKcs è controllata da TNKS e si realizza mediante un'interazione funzionale tra le due proteine, come dimostrato da un recente studio di Dregalla e collaboratori [100].

Gli autori del lavoro hanno scoperto che la trasfezione in cellule umane, Li Fraumeni 057 e 5C fibroblasti, con siRNA che bersagliano TNKS, seguita da trattamento con varie dosi di raggi γ , rende le cellule particolarmente sensibili a qualsiasi danno radio-indotto, aumentando le aberrazioni cromosomiche ai terminali telomerici e compromettendo il riparo dei DSBs. Significativo il dato che la frequenza di delezioni terminali dopo deplezione di TNKS non è molto diversa da quella osservata a seguito dell'inibizione dell'attività chinasi della DNA-PKcs. Dregalla e collaboratori hanno poi confermato lo stretto legame esistente tra queste due proteine, mettendo in evidenza come l'attività parsilasica di TNKS sia essenziale per la stabilità cellulare della DNA-PKcs: la deplezione di TNKS induce una minore parsilazione della chinasi e di conseguenza una sua minore stabilità che ne causa una maggiore degradazione.

Considerato che l'inibizione di TNKS comporta la riduzione dei livelli di DNA-PKcs, e di conseguenza un aumento della radiosensibilità, se ne potrebbero approfondire gli effetti in tumori comunemente trattati con radioterapia, come il MB.

XAV939: studi del trattamento in vivo e in vitro

Lo studio condotto da Dregalla *et al.* per confermare l'importanza della parsilazione nella stabilità di DNA-PKcs si è avvalso di una small molecule di recente acquisizione, in grado di inibire selettivamente l'attività parsilasica di TNKS: XAV939 (Fig. 6).

XAV939 è un composto identificato nel 2009 come inibitore del pathway WNT [99]. La somministrazione della molecola nelle linee cellulari HEK293, DLD-1 e SW480 (cellule di cancro colon-rettale) induceva un accumulo citosolico di

axina, proteina del complesso di degradazione di β -catenina e una conseguente inibizione del pathway WNT. Gli autori hanno messo in evidenza un nuovo meccanismo di azione che vede il coinvolgimento di TNKS in questa via segnalazione. TNKS, infatti, è un regolatore negativo di axina. La parsilazione mediata da TNKS, in questo caso, induce nella proteina una maggiore degradazione. L'inibizione di TNKS quindi causa un accumulo citosolico di axina, sufficiente a ricreare un complesso di degradazione costituito essenzialmente da axina e Gsk-3 β . Questo complesso, a sua volta, induce una iper-fosforilazione di β -catenina che come descritto in precedenza è un segnale per la sua degradazione. Gli stessi autori hanno sottolineato poi come questo processo sia indipendente da APC, altro componente del complesso multiproteico di degradazione.

XAV939 è in grado di legare entrambe le isoforme di TNKS con un'affinità (Kd= 93-99nM) circa dieci volte maggiore rispetto all'affinità di legame con le altre PARP. Oltre alla *parsilazione* di proteine bersaglio, XAV939 blocca anche l'attività *autoparsilasica* di TNKS, comune a tutte le PARP, necessaria per il controllo dei suoi livelli cellulari.

Come ampiamente esposto in precedenza, TNKS è richiesta anche per altri importanti processi fisiologici quali la risoluzione di chiasmi tra cromatidi fratelli e l'assemblaggio del fuso mitotico ma non correlati all'attività di parsilazione dell'enzima. Il fatto che il trattamento di diverse linee cellulari con XAV939 non è stato associato ad alcun arresto mitotico, conferma come la molecola induca inibizione della sola attività parsilasica di TNKS.

XAV939 è stato impiegato anche in uno studio su cellule di glioblastoma multiforme (GMB) al fine di valutare gli effetti dell'inibizione del pathway WNT. È stato infatti dimostrato che nel GBM l'attivazione aberrante di questa via di segnalazione induce maggiore resistenza alle RI. Linee cellulari di GMB isolate da topi irradiati e trattate con XAV939 hanno mostrato una minore presenza di markers di staminalità e un aumento della mortalità cellulare [101].

Ad oggi, comunque, non ci sono studi *in vivo* che testino l'efficacia e gli effetti a livello sistemico di XAV939. La sperimentazione più vicina ad una condizione "*in vivo*" è stata proposta da Fancy *et al.*, in un lavoro in cui si è evidenziato il coinvolgimento di axina nella rimielinizzazione degli oligodendrociti [102]. In questo studio la potenziale efficacia di XAV939 *in vivo* è stata testata, con buoni risultati, somministrando la molecola direttamente in fratture indotte nei topi. Ovviamente questo tipo di approccio non è paragonabile ad uno studio sistemico di XAV939 in cui si valuti clearance, farmacocinetica e farmacodinamica. Ulteriori studi sono quindi necessari per chiarire le potenzialità cliniche di questa molecola.

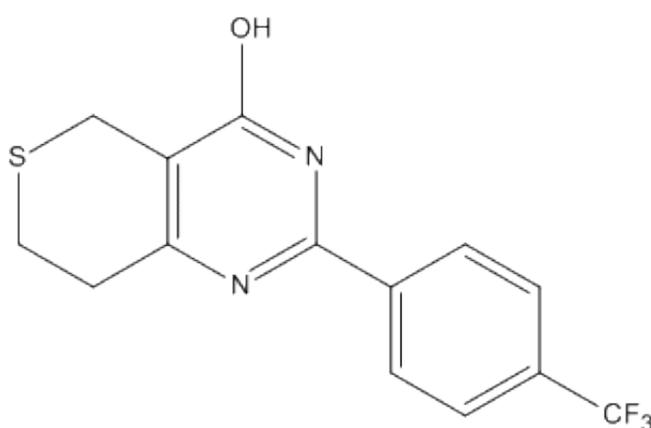


Fig. 6. Struttura molecolare della small molecule XAV939, specifico e potente inibitore di Tanchirasi (membro della super-famiglia delle PARP)

SCOPO DELLA TESI

Il MB è il tumore cerebrale embrionale più comune dell'età pediatrica [1, 2, 3]. La terapia convenzionale prevede asportazione chirurgica della massa tumorale seguita da radioterapia [9, 14, 15, 67, 68]. Quest'ultima risulta essere molto efficace ma provoca dei gravi effetti collaterali nei lungo sopravvissuti ed un terzo dei pazienti presenta radioresistenza intrinseca [7, 8]. Per tali motivi, importanti sfide per la ricerca sono l'aumento della radiosensibilità e/o il superamento della radioresistenza.

Da questo punto di vista, un approccio molto promettente potrebbe essere quello della *target therapy* [75, 76], in cui si cerca di aumentare la sensibilità delle cellule tumorali ai diversi chemioterapici e alla radioterapia, andando a colpire, bersagliare, quei pathway e quelle proteine fondamentali per la crescita tumorale o per la resistenza ai vari trattamenti, come ad esempio le vie di segnalazione coinvolte nei meccanismi di riparo al DNA.

Nel corso degli anni è emersa l'importanza, in tale contesto, della superfamiglia delle PARP (Poli ADP-Ribosio Polimerasi), proteine cruciali per il corretto funzionamento dei diversi meccanismi di controllo e di riparazione del danno al genoma. PARP-1 è, tra queste proteine, quella più studiata; infatti, sono stati sintetizzati e testati numerosi composti in grado di inibirne l'attività. Alcuni di questi composti sono anche entrate in studi di fase III [107, 108].

Solo recentemente, invece, sono state sottolineate la potenzialità terapeutiche di un altro membro della famiglia delle PARP : Tanchirasi (TNKS), o PARP-5 [79, 80, 81, 82, 83, 84]. Questo enzima regola uno dei due meccanismi fondamentali nella risposta al danno genotossico inferto alla doppia elica del DNA (*double strand breaks*, DSBs): la "saldatura non omologa delle estremità" (NHEJ) [100]. Le radiazioni ionizzanti (RI) utilizzate in terapia sono particolarmente letali proprio perché inducono principalmente DSBs. Da ciò si può dedurre che

l'inibizione di TNKS dovrebbe comportare, potenzialmente, una minore capacità da parte delle cellule tumorali di rispondere al danno inferto dalle RI.

È inoltre emerso il coinvolgimento di TNKS nella regolazione del pathway WNT [99]. Tale via di segnalazione è strettamente correlata alla patogenesi del MB [6, 32, 49] e la sua importanza in questa neoplasia è stata confermata in una recente classificazione condotta su base molecolare, in cui si associa all'attivazione aberrante del pathway WNT, un sottogruppo di MB con caratteristiche peculiari [33].

In questo studio ci proponiamo di studiare gli effetti dell'inibizione di TNKS in linee cellulari di MB umano mediante la *small molecule* XAV939 [99] che risulta essere, ad oggi, l'inibitore più potente e specifico di questo enzima. Ci soffermeremo, in particolar modo, sugli effetti della co-somministrazione della molecola e delle RI sulla vitalità e mortalità cellulare, capacità clonogenica ed efficacia nei meccanismi di riparo dei DSBs.

MATERIALI E METODI

Linee cellulari

Lo studio di TNKS come possibile target terapeutico nel MB è stato realizzato su due diverse linee immortalizzate di MB umano: ONS76 (variante istologica classica) e DAOY (variante desmoplastica).

La linea ONS76 è stata isolata e immortalizzata per la prima volta nel 1989 da un tumore indifferenziato del cervelletto di una bambina di 2 anni [103]. Le cellule hanno una morfologia epiteliale e in coltura crescono aderenti e in monostrato. Il tempo di duplicazione è di circa 18 ore. Le cellule crescono in terreno RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*, Euroclone) con FBS (*Foetal Bovine Serum*, Invitrogen Corporation; Frederick, MD) al 10%, 1% di L-glutammina 2mM (Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR), 1% cocktail penicillina/streptomina e 1% amminoacidi non essenziali (*Eagle's non essential amino acid*, Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR).

La linea DAOY è una linea ipertetraploide, isolata nel 1985 dal cervelletto di un paziente maschio di 4 anni [104]. Anche questa linea cresce in aderenza e in monostrato. Il terreno a loro idoneo è costituito da MEM (*Minimum Essential Medium with earle's salt*, Invitrogen Corporation; Frederick, MD) addizionato di 20% di FBS, 1% di L-glutammina, 1% di amminoacidi non essenziali, 1% di sodio piruvato (Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR).

Trattamento farmacologico e/o con radiazioni

I campioni sono stati trattati con uno specifico inibitore di TNKS (XAV939) o con un ugual volume del solvente DMSO (nei controlli), sottoposti a RI o a una co-somministrazione di farmaco e RI.

XAV939

XAV939 (Sigma-Aldrich) è una *small molecule* in grado di inibire selettivamente e con un'alta affinità le due isoforme di TNKS (IC₅₀ = 0,011 e 0,004 per TNKS1 e TNKS2 rispettivamente). È solubile in DMSO (dimetil-solfossido) fino alla concentrazione di 50 mM e, in forma solida, si conserva a temperatura ambiente.

La soluzione risospesa in DMSO ad una concentrazione di 5 mM è stata aliquotata e conservata a -20°C, al buio.

La molecola è stata aggiunta direttamente nel terreno di coltura. Diverse dosi sono state saggiate per valutarne l'efficacia. Negli esperimenti esposti è stata utilizzata sempre la dose 5 µM, che è risultata essere la più idonea e più efficace. La quantità di DMSO utilizzata era, in ogni caso, ad una concentrazione tale da non risultare tossica per le cellule.

Radiazioni Ionizzanti

Le cellule sono state irradiate con raggi γ (sorgente ¹³⁷Cs), *dose rate* di circa 2 Gy/min, mediante l'utilizzo dell'*Irradiateur Biologique 437C* (CIS-BIO; Cedex, FR). Per gli esperimenti di vitalità cellulare, mortalità cellulare, clonogenicità è stata utilizzata una o, al più, due dosi di RI da 2 Gy. Solo per il Neutral Comet Assay è stata utilizzata una dose da 10 Gy.

Western blotting (WB)

L'analisi in WB ci ha permesso di valutare, e in seguito ad analisi densitometrica, di quantificare l'espressione proteica dei target molecolari di TNKS: axina e DNA-PKcs (in estratti totali), β -catenina (in lisati totali e nucleari). Per quanto riguarda la DNA-PKcs, i campioni sono stati analizzati in

seguito a corsa elettroforetica su gel a gradiente, la cui preparazione è descritta in modo dettagliato successivamente.

Preparazione dei lisati totali

L'estrazione proteica totale è stata condotta su cellule staccate con *cell scraper*, dopo due lavaggi in PBS freddo, mantenendo la fiasca di coltura in ghiaccio. La sospensione cellulare in PBS freddo è stata in seguito trasferita in una provetta da 15 ml e centrifugata a 2000 rotazioni per minuto (RPM) per 5 minuti a 4°C. Eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 1V/V di buffer di lisi (1% Triton X100, 10% glicerolo, Tris 50Mm, pH 7,4, NaCl 150Mm, 2mM EDTA, MgCl₂ 2mM) addizionato di inibitori delle proteasi [25X *Complete* EDTA free, Roche Diagnostic; Indianapolis (IN), utilizzato alla concentrazione 2X]. La sospensione è stata poi incubata in ghiaccio per 15 minuti siringando e vortexando più volte. I campioni sono stati ulteriormente centrifugati a 12000 RPM per 30 minuti a 4°C. Il surnatante, contenente l'estratto proteico totale, è stato aliquotato in eppendorf da 0,2ml, frizzato in azoto liquido e conservato a -80°C, fino al momento dell'utilizzo.

Preparazione dei lisati nucleari

L'estrazione proteica nucleare è stata effettuata su cellule staccate con *cell scraper*, dopo due lavaggi in PBS freddo, mantenendo la fiasca di coltura in ghiaccio. La sospensione è stata successivamente trasferita in una provetta da 15 ml e centrifugata a 771g per 5 minuti a 4°C. Il pellet, risospeso in 1 ml di PBS, è stato trasferito in eppendorf da 1,5 ml e quindi nuovamente centrifugato a 367g per 8 minuti a 4°C. Al pellet cellulare ottenuto, sono stati aggiunti 500 µl di buffer ipotonico (HEPES 10mM pH 7.9, MgCl₂ 1.5mM, KCl 10mM) addizionato di un cocktail di inibitori delle proteasi Complete 2X.

Un'ulteriore centrifugazione a 367g per 5 minuti a 4°C è servita per eliminare i sali residui di PBS. Eliminato il sovrnatante, sono stati aggiunti 200 µl di buffer

ipotonico, addizionato di una soluzione di proteasi Complete 2X. La sospensione è stata lasciata in incubazione per 10 minuti in ghiaccio, siringando e vortexando più volte.

Dopo aver centrifugato a 827g per 15 minuti a 4°C, nel sovrnatante si trovavano le proteine citoplasmatiche e nel pellet i nuclei isolati, trattati successivamente con 50 µl di LOW buffer (HEPES 20mM pH 7.9, Glicerolo 25%, KCl 20mM, MgCl₂ 1.5mM, EDTA 0.2mM) e 50 µl di HIGH buffer (HEPES 20mM pH 7.9, Glicerolo 25%, KCl 1.2M, MgCl₂ 1.5mM, EDTA 0.2mM), entrambi addizionati del Complete 2X. I campioni sono stati lasciati in incubazione in ghiaccio per 30 minuti, siringando e vortexando più volte. Terminata l'incubazione, si è proceduto ad una centrifuga a 13225g per 30 minuti a 4°C e il sovrnatante, contenente le proteine nucleari, è stato aliquotato in provette da 0.2 ml, congelato in azoto liquido e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Quantificazione proteica

La quantificazione delle proteine, presenti nell'estratto totale o nucleare, è stata effettuata allo spettrofotometro (*Ultrospec 1000; Amersham Pharmacia Biotech; Little Chalfont, UK*), utilizzando il *Dye Reagent (Biorad Laboratories GmbH; Munchen, DE)* per il saggio di Bradford.

Corsa elettroforetica, blotting e rilevazione dei dati

Al momento della corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide, gli estratti proteici (nucleari o totali) sono stati miscelati con SDS loading buffer (Tris-HCl 0.5M pH 6.8, SDS, Blu di Bromofenolo 0,1%, Glicerolo, β-mercaptoetanololo) e denaturati a 95°C in bagnetto termostato per 5 minuti. Uguali quantità di proteine sono state sottoposte a corsa elettroforetica in gel al 10% di poliacrilammide (gel inferiore: Acrilammide bis, Tris-HCl pH 8.8, ddH₂O, SDS 10%, APS 10%, Temed; gel superiore: Acrilammide bis, Tris HCl pH 6.8,

ddH₂O, SDS 10%, APS 10%, Temed) a 20 mA, insieme al marker (*Full Range Rainbow MW Marker, Amersham Biosciences; Little Chalfont, UK*) e, in caso di pozzetti vuoti, all' SDS *loading buffer* 1X. Dopo la corsa si è proceduto al trasferimento delle proteine su una membrana di nitrocellulosa (*Hybond-C Extra, Amersham Biosciences; Little Chalfont, UK*), mediante l'applicazione alla camera di trasferimento preraffreddata, di un amperaggio di 800 mA per la durata di 45 minuti. Per controllare l'avvenuto trasferimento la membrana, dopo l'elettroblotting, è stata colorata temporaneamente con rosso *Ponceau*. I siti aspecifici sono stati bloccati incubando le membrane in *blocking solution* (TBS 1X dato da 20mM Tris-HCl, 137mM NaCl, pH 7.6; 0.1% Tween-20; al 5% di latte scremato non grasso in polvere) per 60 minuti a temperatura ambiente e in agitazione. La membrana è stata poi risciacquata velocemente in TBS-T (TBS 1X, 0.1% Tween-20) e sottoposta a diversi lavaggi in TBS-T.

Per la rilevazione delle bande la membrana è stata incubata con i seguenti anticorpi primari: anti-axin (R20, *Biotechnology Santa Cruz*, 1:500 in *blocking solution*) anti- β -catenina (H102, *Biotechnology Santa Cruz*, 1:1000 in *blocking solution*), anti-DNA-PKcs (*Abcam*, 1:100 in TBS-T), anti-lamin B (*Abcam*, 1:1000 in *blocking solution*), anti- β -actin (I-19, *Biotechnology Santa Cruz*; 1:1000 in *blocking solution*), utilizzati singolarmente. L'incubazione del primario ha sempre avuto una durata di un'ora.

Dopo aver lavato la membrana con TBS-T, per rimuovere l'anticorpo primario non legato, la stessa è stata incubata con i seguenti anticorpi secondari: anti-rabbit per lamina B e β -actina, diluito 1:10000 in *blocking solution* (clone, *Abcam*), anti-goat per β -catenina e axina (clone, *Abcam*), diluito 1:500 in *blocking solution* e anti-mouse, diluito 1:10000 in TBS-T per DNA-PKcs. L'incubazione ha avuto una durata di 45 minuti per tutti gli anticorpi secondari. La detection è stata effettuata dopo 5 lavaggi in TBS-T, incubando la membrana per 60 secondi a temperatura ambiente e al buio con il kit *Enhanced chemoluminescence (ECL-PLUS, Amersham Biosciences; Little Chalfont, UK)*.

La membrana è stata impressionata su lastra *Hyperfilm ECL* (Amersham Biosciences; Little Chalfont, UK) e in seguito opportunamente sviluppata. La lastra è stata acquisita con uno scanner (*Canon 993 OF*) e i segnali sono stati quantificati usando uno specifico *software* densitometrico (*Gel-Pro Analyzer, Version 3.0*; Media Cybernetics; Silver Spring, MD, USA).

Corsa elettroforetica su gel a gradiente (3.5% - 12%)

Per l'analisi del profilo di espressione della DNA-PKcs, gli estratti proteici totali di cellule trattate con XAV939 o con DMSO sono stati fatti correre su un gel a gradiente. La DNA-PKcs è infatti una proteina dal peso molecolare di 460 kDa e l'utilizzo di un gel a gradiente ha permesso di avere su un medesimo gel (e successivamente su di un'unica membrana) una proteina dal peso così grande e contemporaneamente β -actina, il normalizzatore da noi adottato, dal peso molecolare di circa 70 kDa.

Il running gel, nel quale si sono stratificate le proteine, è stato ottenuto mescolando soluzioni a diversa concentrazione di acrilammide con piccole quantità di bis-acrilammide, in presenza di due catalizzatori (Temed, APS).

Le due miscele, quella al 3,5% (acrilammide 30%, TRIS 1.5M, pH 8.8) e quella al 12% (acrilammide 30%, TRIS 1.5M pH 6.8, saccarosio), sono state poi addizionate con SDS 10%, Temed e APS 10%, per promuoverne la polimerizzazione. Successivamente sono state versate in un supporto solido con l'ausilio di un gradientatore e di una pompa peristaltica in modo da mantenere un flusso costante delle due miscele.

Dopo aver polimerizzato, il gel è stato lavato con *running buffer* (TRIS 0.025M, glicina 0.192M, SDS 0.1%). Successivamente è stato colato lo *stacking gel* (acrilammide 30%, TRIS 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, APS 10%, TEMED). I campioni sono stati preparati, per la corsa elettroforetica, seguendo la stessa procedura riportata in precedenza.

La corsa elettroforetica è stata condotta a voltaggio costante di 110V, in ghiaccio per 12-16 ore.

Dopo la corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Il gel, a contatto con la membrana è stato inserito nell'unità di trasferimento. Il trasferimento è avvenuto in transfer buffer (TRIS 0.025M, glicina 0.192M) ad un amperaggio costante di 1,5 A per 6 ore.

Per controllare l'avvenuto trasferimento la membrana, dopo l'elettroblotting, è stata colorata temporaneamente con rosso *Ponceau*. I siti aspecifici sono stati bloccati incubando la membrana in *blocking solution* (TBS 1X dato da 20mM Tris-HCl, 137mM NaCl, pH 7.6; 0.1% Tween-20; al 5% di latte scremato non grasso in polvere) per 60 min a temperatura ambiente e in agitazione.

Curve di crescita

Gli effetti biologici sulla proliferazione cellulare sono stati valutati mediante comparazione di curve di crescita, o *growth curves assay*.

Le cellule, 16h dalla piastratura in fiasche T25 alla concentrazione di 1×10^5 cellule per fiasca, sono state trattate con XAV939 alla concentrazione indicata e raccolte a 24, 48, 72, 96 o 120 h dalla somministrazione della molecola.

Per ogni time point, le cellule raccolte sono state contate al microscopio ottico, con l'ausilio di una camera di Neubauer.

I dati ottenuti sono stati *plottati* su un sistema di assi cartesiani in cui ogni punto è individuato da due coordinate, ovvero il numero delle cellule, in ordinata e il tempo a cui si è realizzata la conta, in ascissa.

Le curve di crescita così ricavate a seguito dei vari trattamenti (DMSO, XAV939, RI, XAV939 e RI) sono state tra loro comparate per eventuali differenze statistiche.

Valutazione della mortalità cellulare

Il test di esclusione in Trypan Blue o *Trypan blue exclusion Assay* permette di stimare la mortalità cellulare e, in ambito farmacologico, la citotossicità di una qualsiasi sostanza *in vitro*.

In seguito ai vari trattamenti le cellule sono state raccolte, centrifugate (a non più di 1200 RPM) e risospese in 1 mL di PBS. Un'aliquota di sospensione omogenea è stata miscelata al *Trypan Blue*, con diluizione 1:2, e inserita in una camera di Neubauer per la conta cellulare: le cellule che presentavano un'evidente colorazione blu venivano considerate non vitali. Ogni trattamento è stata effettuato in triplicato ed ogni conta in duplicato.

Infine la mortalità cellulare è stata calcolata come percentuale di cellule morte rispetto alla totalità:

$$(cellule\ morte/cellule\ totali) \times 100$$

Analisi della capacità clonogenica

L'*Adherent colony forming assay* è stato utilizzato per valutare la capacità clonogenica delle linee cellulari a seguito dei diversi trattamenti.

A questo scopo le cellule sono state piastrate in *culture dishes* (60 mm) alla concentrazione di 300-500 cells/dish, in 3ml del terreno d'elezione per la linea cellulare con l'opportuna concentrazione di FBS. A 16h dalla semina, le cellule sono state trattate con 5 μ M di XAV939; alle *dishes* di controllo sono state addizionati uguali volumi di DMSO. Nel caso del co-trattamento con RI, le cellule sono state irradiate con una dose da 2 Gy, dopo 8h dal trattamento farmacologico. Il terreno veniva rinnovato ogni 72h.

Periodicamente, tutte le *dishes* sono state osservate al microscopio ottico per apprezzare la formazione delle colonie. Al termine dell'esperimento, che ha avuto la durata di circa 10 giorni, le cellule sono state fissate in paraformaldeide e colorate con cristal violetto (utilizzato alla concentrazione di 1 mg/mL). Successivamente alla fissazione sono state contate mediante stereoscopio solo le colonie formate da più di 50 cellule.

Inoltre i dati raccolti sono stati utilizzati per calcolare il *Surviving Factor at 2 Gy* (SF2), ovvero la frazione di colonie sopravvivenenti in seguito all'esposizione di 2 Gy di RI. Questo indice è spesso utilizzato per valutare quanto uno specifico trattamento incide sulla radiosensibilità. Un valore alto di SF2 (il massimo è 1) è indice di maggiore radioresistenza. Si calcola secondo la seguente formula:

$$(n^\circ \text{ di colonie dopo 2 Gy di RI} / n^\circ \text{ di colonie nel controllo non irradiato}) \times 100$$

Neutral Comet Assay

Il gel-elettroforesi su singola cellula, o *Comet Assay*, è stato condotto in condizioni neutre. In questo modo il saggio è in grado di evidenziare solo il danno *double strand* al DNA. Il saggio prevede diverse fasi: la preparazione dei vetrini, l'inclusione delle cellule in agar, la lisi e successiva corsa elettroforetica dei campioni, colorazione dei vetrini e acquisizione delle immagini.

Per ogni campione e per ogni time point, sono stati realizzati almeno 2 vetrini distinti, da cui sono state analizzate non più di 50 comete per vetrino. Ogni esperimento è stato comunque ripetuto almeno tre volte.

Di seguito sono riportati i dettagli di ogni *step*.

Silanatura dei vetrini

Previa pulizia dei vetrini con alcol puro per togliere i residui di polvere, i vetrini vengono immersi per 5 minuti in una soluzione di HCl 1N per sgrassarli e per eliminare tracce di alcol. Vengono poi lavati velocemente in una soluzione di acetone puro e lasciati immersi per 5 minuti in una soluzione di acetone e silano. Terminato questo tempo i vetrini vengono nuovamente lavati in una soluzione di acetone puro per eliminare eventuali residui di silano. Vengono infine messi ad asciugare in stufa a 60°C per 10 minuti.

Preagarizzazione dei vetrini

Successivamente alla silanatura, si procede con la preagarizzazione dei vetrini con del *Normal Melting Agarose* (NMA). Questa operazione serve principalmente per creare uno strato che permetta alle cellule di correre meglio e per evitare che gli strati successivi si stacchino. I vetrini vengono immersi uno alla volta in una giara contenente 100 ml di NMA a 70°C per 20 secondi. I vetrini vanno poi lasciati asciugare all'aria.

Trattamento dei campioni (con XAV939 e/o radiazioni)

Le cellule sono state trattate con DMSO o XAV939 e successivamente irradiate con una dose da 10 Gy di RI. I vari campioni sono stati sottoposti alle successive fasi del Comet Assay subito dopo il trattamento con le radiazioni (tempo zero), 16 o 24 ore dalle RI. L'acqua ossigenata alla dose 5 µM per 15 minuti è stata utilizzata come controllo negativo.

Una volta eliminato il terreno, le cellule sono state lavate con PBS freddo (pH=7.2), staccate meccanicamente mediante *cell scraper* (per evitare l'utilizzo di tripsina o di alte temperature), raccolte in falcon da 15mL e poste a centrifugare (2500 RPM per 5 minuti).

Inclusione in agarosio

Una volta risospeso il pellet in PBS freddo, le eppendorf sono state nuovamente centrifugate (2500 RPM per 10 minuti). Il pellet è stato risospeso in 500 µL di *Low Melting Agarose* (LMA) facendo molta attenzione affinché la temperatura del LMA non fosse troppo alta; 85µL di questa sospensione cellulare sono stati posti su ciascun vetrino preagarizzato, facendo cadere delle gocce su tutta la superficie del vetrino. Dopo aver adagiato un vetrino coprioggetto sulla sospensione di cellule in agarosio, i vetrini sono stati riposti a 4°C per 20 minuti. Trascorso questo tempo, il coprioggetto è stato tolto per permettere l'aggiunta di altri 85µL di LMA puro sul vetrino. A questo punto è stato disposto un nuovo coprioggetto e i vetrini riposti a 4°C per ulteriori 20 minuti.

Lisi delle cellule

La lisi delle cellule è uno dei passaggi critici di tutto il test. Bisogna evitare l'utilizzo di alte temperature che possono falsare l'esito del saggio e di pH superiori a 8 (nella versione neutrale). Perciò i vetrini sprovvisti di coprioggetto vengono posti per 4 ore a 37°C in una giara contenente la soluzione di lisi, definita N1, composta da: 2% Sarkosyl, 0,5M Na₂EDTA, pH=8.0.

Corsa elettroforetica

I vetrini sono stati tolti dalla soluzione N1 e posti, per 30 minuti, in un'altra giara contenente la soluzione di corsa (N2) composta da: 90mM di Tris buffer, 90mM di acido borico, 2mM Na₂EDTA con un pH di 8.5. Concluso questo tempo, i vetrini sono stati posti nella camera di corsa contenente la soluzione N2 per 25 minuti ad un amperaggio costante di 7mA. La camera di corsa è stata posta in ghiaccio per evitare aumenti imprevisti di temperatura. Terminata la corsa i vetrini sono stati posti in una giara contenente H₂O distillata.

Colorazione e acquisizione delle immagini

Tolti i vetrini dall'acqua, si procede alla colorazione: vengono posti su ciascun vetrino 75µL di una soluzione di Etidio Bromuro 20µg/mL, poi coperti con un coprioggetto. Così preparati, i campioni restano stabili e le comete visibili per non più di 2 giorni, prima del decadimento dell'intercalante. I vetrini sono stati visualizzati mediante un microscopio a fluorescenza collegato ad un computer. Sono state fatte delle fotografie a vari campi del vetrino dove erano presenti le comete mediante il software ACT1.

Analisi dei vetrini

Tramite il software CASP sono state analizzate le fotografie ottenute. Questo programma permette di calcolare la lunghezza della coda della cometa e l'intensità della stessa, e in questo modo permette di calcolare il momento di coda o *Tail Moment* che è il parametro più comunemente utilizzando come indice del danno genotossico: un maggiore Tail Moment corrisponde ad un maggior danno inferto al DNA.

$$TM = \% \text{ Tail DNA} \times \text{length Tail}$$

Analisi statistica dei dati

Ogni esperimento è stato condotto almeno in duplicato e in tre esperimenti indipendenti. I dati ottenuti sono stati analizzati per la significatività statistica mediante il Software GraphPad 5.0, utilizzando un one-way ANOVA (Trypan blue exclusion Assay, Adherent colony forming assay) o un two-way ANOVA (growth curves assay); un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

XAV939 inibisce il pathway WNT e la subunità catalitica del complesso DNA-PK in linee cellulari di MB

Il primo step è stato quello di verificare l'efficacia di XAV939 nell'inibire selettivamente l'attività parasitica di TNKS nelle due diverse linee immortalizzate di MB umano da noi utilizzate: DAOY e ONS-76. Abbiamo cioè analizzato, mediante Western Blot (WB), se la somministrazione della small molecule, comportasse una modulazione dei target molecolari di TNKS.

In letteratura è riportato che l'inibizione di questo enzima induce inibizione del signalling di WNT, in quanto causa un aumento dei livelli citosolici di axina e, conseguentemente, una diminuzione dei livelli proteici di β -catenina [99].

Nelle nostre linee cellulari, abbiamo riscontrato, a 8 ore dalla somministrazione di XAV939 (alla concentrazione 5 μ M), un effettivo aumento dei livelli proteici di axina. La diminuzione dei livelli di β -catenina è stata invece osservata 16 ore dopo la messa in coltura del farmaco, sia negli estratti totali che, in particolar modo, negli estratti nucleari.

Mediante analisi densitometrica, abbiamo rilevato, a seguito del trattamento con XAV939, un aumento dell'80% dei livelli totali di axina nelle ONS-76 e un aumento del 70% nelle DAOY. L'espressione proteica di β -catenina, invece, si riduce di circa il 30% negli estratti proteici totali e dell'80% negli estratti nucleari (Fig.7, A e B).

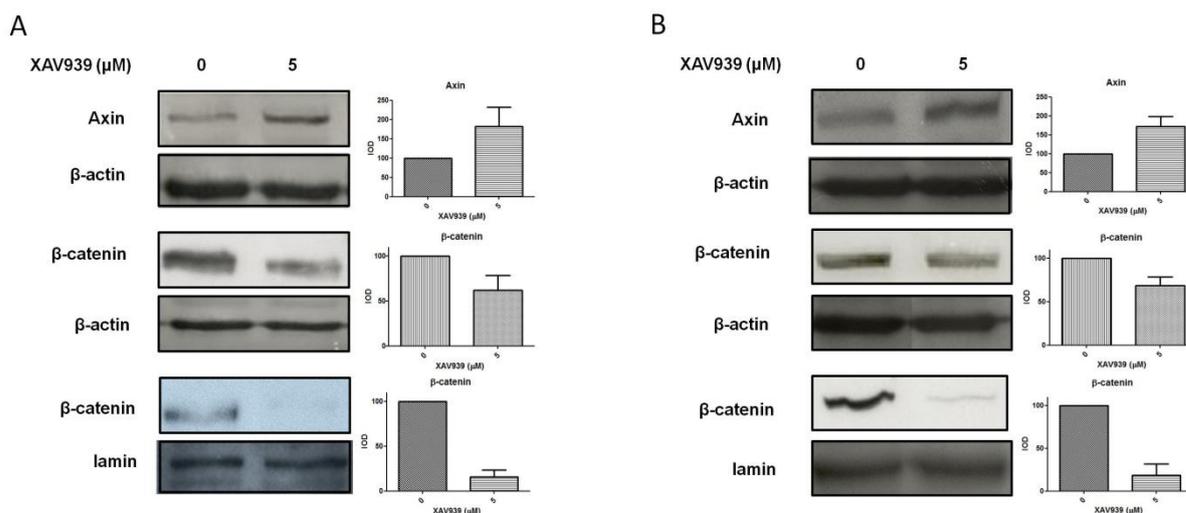


Fig. 7. WB e relativa indagine densitometrica di axina, β -catenina (in estratti totali e nucleari) su ONS-76 (A) e DAOY (B) a seguito della somministrazione di 5 μ M di XAV939. La molecola induce un aumento dei livelli totali di axina (a 8 ore dalla messa in coltura di XAV939) e una conseguente diminuzione dei livelli di β -catenina (dopo 16 ore dalla somministrazione) sia in estratti totali (normalizzati con β -actin) che in estratti nucleari (normalizzati con la lamin)

Successivamente abbiamo verificato che l'azione di XAV939 inducesse anche inibizione del pathway DNA-PK. È stato infatti dimostrato che l'attività parsilasica di TNKS è fondamentale per il corretto funzionamento della subunità catalitica di questa via di segnalazione, in quanto ne induce stabilità [100].

Esaminando i livelli proteici di DNA-PKcs, tramite WB, dopo corsa elettroforetica in gel a gradiente (12% - 3.5%), abbiamo constatato che a 8 e 16 ore dalla somministrazione del farmaco la molecola è in grado di ridurre l'espressione della proteina del 40% rispetto al controllo, nelle ONS-76 (Fig. 8A) e del 50% nelle DAOY (Fig. 8B).

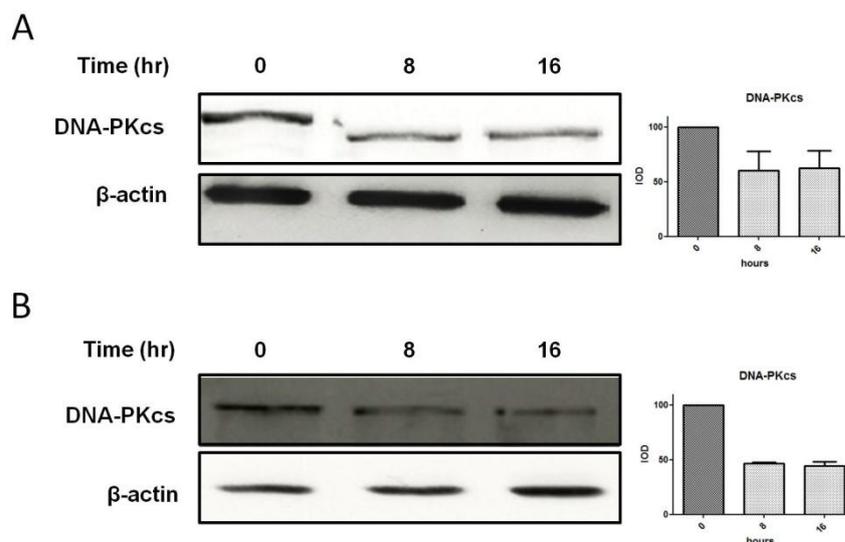


Fig. 8. WB, a seguito di corsa elettroforetica su gel a gradiente, e relativa indagine densitometrica di DNA-PKcs (in estratti totali) su ONS-76 (A) e DAOY (B) a seguito della somministrazione di 5 μ M di XAV939. La molecola induce una diminuzione significativa dei livelli proteici della proteina (a 8 e 16 ore dalla messa in coltura)

L'aumento dei livelli citosolici di axina seguito dalla riduzione dei livelli proteici di β -catenina (in modo più accentuato a livello nucleare) e l'inibizione dell'espressione proteica di DNA-PKcs confermano l'efficacia della small molecule nell'inibire TNKS in linee cellulari di MB umano.

Il trattamento congiunto di XAV939 e RI induce una forte inibizione della capacità proliferativa e clonogenica

Gli effetti di XAV939 e delle RI sulla vitalità cellulare delle linee cellulari di MB sono stati studiati mediante comparazione delle curve di crescita, o *growth curves assay*. Le cellule sono state trattate con una concentrazione 5 μ M di farmaco, o con un ugual volume di DMSO, con una dose di radiazioni da 2 Gy, o con una combinazione di XAV939 e RI.

Come evidenziato in Fig.9, il co-trattamento di XAV939 e RI induce una massiccia inibizione della capacità proliferativa in entrambe le linee cellulari.

Nelle DAOY abbiamo evidenziato una maggiore inibizione della proliferazione cellulare 72 ore dopo il trattamento con XAV939 e RI, con una riduzione della crescita cellulare del 69.2% rispetto alle cellule di controllo non irradiate ($p < 0.001$, two-way ANOVA) e del 42.65% rispetto a cellule irradiate ma non trattate con il farmaco ($p < 0.01$, two-way ANOVA). Nelle ONS-76, invece, il co-trattamento è risultato più incisivo a 96 ore dalla somministrazione di XAV939, con una inibizione della proliferazione del 75% in confronto a cellule di controllo non irradiate ($p < 0.001$, two-way ANOVA) e del 34% rispetto a cellule irradiate non trattate con la small molecule ($p < 0.01$, two-way ANOVA). Dal confronto delle curve di crescita, possiamo evidenziare, inoltre, come già il solo trattamento con il farmaco induca in entrambe le linee cellulari una inibizione della proliferazione, paragonabile a quella dovuta al trattamento con una dose da 2 Gy di RI. Più nello specifico, la più forte inibizione è stata riscontrata a 72 ore dal trattamento con XAV939 per entrambe le linee cellulari, con una riduzione pari al 48.1% rispetto al controllo non trattato nelle ONS-76 e del 38.9% nelle DAOY ($p < 0.01$ e $p < 0.001$ rispettivamente, two-way ANOVA).

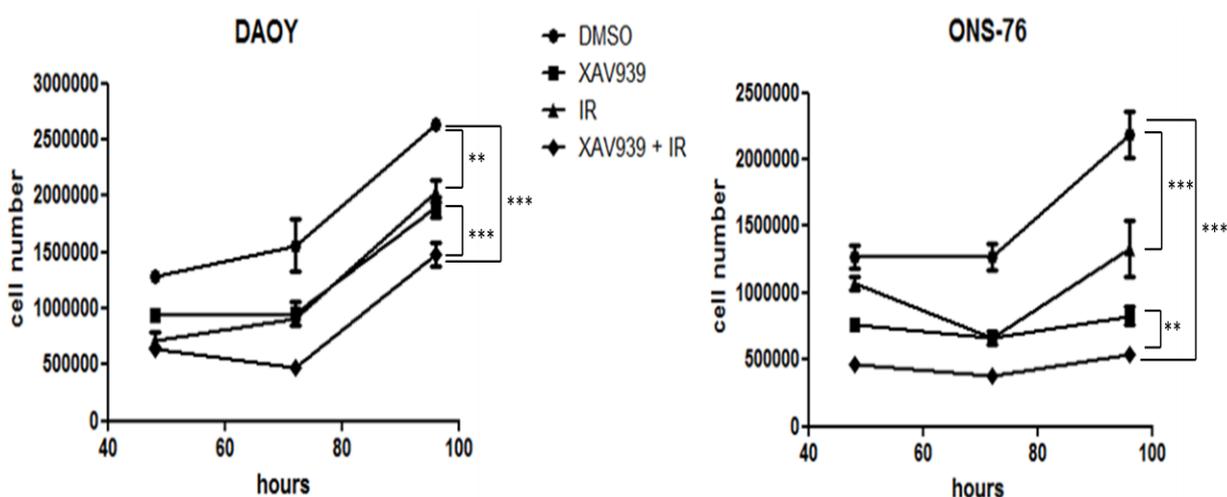


Fig. 9. XAV939 induce, rispetto al controllo trattato con DMSO, una inibizione della capacità proliferativa, in entrambe le linee cellulari, comparabile a quella ottenuta a seguito del trattamento con una dose da 2 Gy di RI. La più incisiva diminuzione della proliferazione si evidenzia a seguito del co-trattamento di XAV939 e RI. Le cellule venivano piastrate in

fiasche T25 ad una concentrazione ottimale e contate ogni 24 ore; le curve di crescita ottenute venivano confrontate mediante test statistico

Risultati del tutto analoghi sono stati ottenuti nello studio della capacità clonogenica a seguito dei trattamenti. Entrambe le linee cellulari hanno mostrato, infatti, una significativa inibizione della capacità di formare colonie (pari al 38%) a seguito di una somministrazione di 5 μ M di XAV939, in confronto a cellule trattate con DMSO ($p < 0.01$, one-way ANOVA).

Come riscontrato nell'analisi della capacità proliferativa, anche nel caso della clonogenicità, la maggiore inibizione è stata registrata a seguito del trattamento congiunto XAV939 - RI.

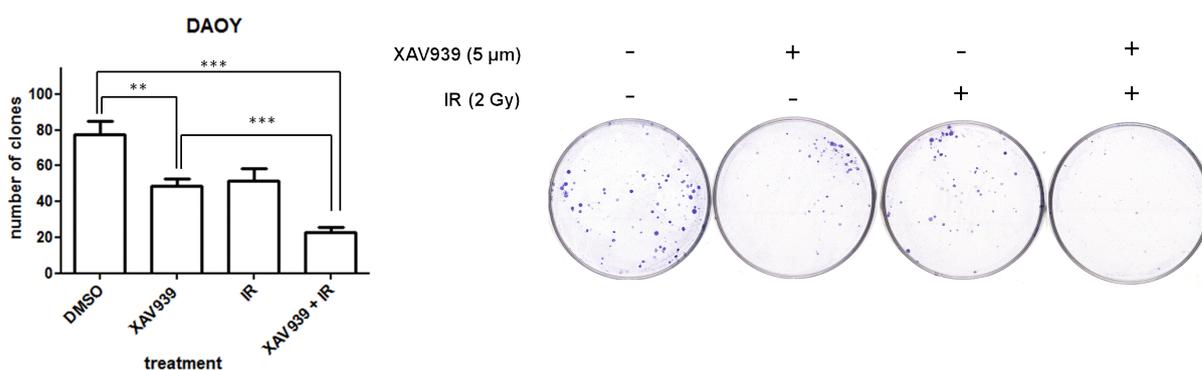


Fig. 10. Nelle DAOY, XAV939 (5 μ M) induce una sostanziale inibizione della capacità clonogenica, paragonabile a quella riscontrata a seguito del trattamento con una dose da 2 Gy di RI. Il co-trattamento induce una drastica riduzione della capacità clonogenica. A sinistra il grafico risultante da tre conte indipendenti delle colonie formate a seguito dei vari trattamenti; a destra, un esempio di quanto ottenuto: circa 300/500 cellule venivano piastrate in 3 mL di terreno in dish da 60mm; in seguito ai trattamenti (nell'ordine: DMSO, XAV939, RI, XAV939 + IR) si apprezzava la formazione delle colonie in adesione

Nelle DAOY, come si può evincere in Fig.10, abbiamo osservato una riduzione del numero di colonie pari al 70.6% nelle cellule sottoposte al co-trattamento rispetto a cellule controllo non irradiate ($p < 0.001$, one-way ANOVA) e del 55.6% rispetto a quelle irradiate ma non trattate con XAV939 ($p < 0.01$, one-

way ANOVA). Nelle ONS-76 (Fig. 11), invece, l'inibizione della capacità clonogenica è stata rispettivamente del 81% ($p < 0.001$, one-way ANOVA) e del 67.9% ($p < 0.05$, one-way ANOVA).

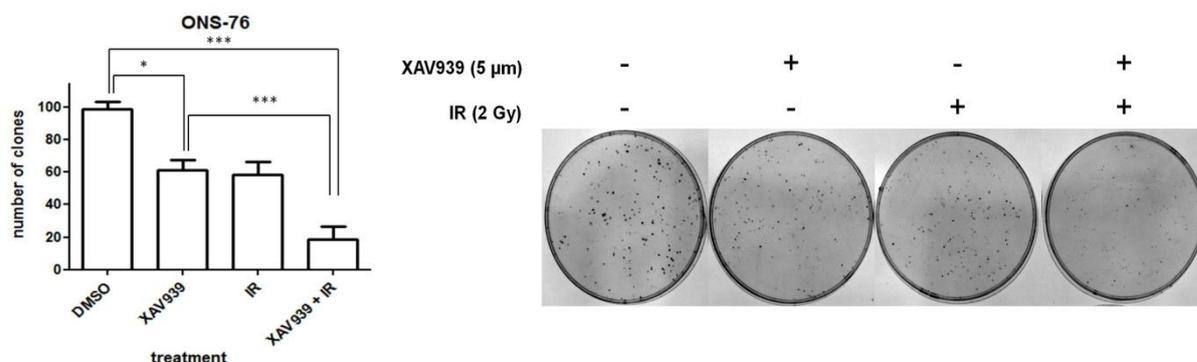


Fig. 11. Nelle ONS-76, l'andamento della clonogenicità in risposta ai vari trattamenti è del tutto simile a quanto già descritto per le DAOY

Da questi dati abbiamo potuto determinare la “frazione sopravvivente a 2 Gy” o *Surviving Fraction at 2 Gy* (SF2), uno degli indici più utilizzati per quantificare un possibile aumento della radiosensibilità. In entrambe le linee cellulari l'SF2 subisce, a seguito del trattamento con XAV939, una sensibile diminuzione: nelle DAOY si riduce da 0.66 a 0.29 e nelle ONS-76 da 0.58 a 0.19.

XAV939 induce una minore capacità di riparare il danno double strand del DNA indotto dalle RI

L'effetto citotossico di maggior rilievo indotto dalle RI è la rottura del doppio filamento di DNA (DNA-DSBs, *Double Strand Breaks*)[105]. Il pathway della Protein Chinasi DNA-dipendente, DNA-PK, è uno dei due maggiori signalling, come precedentemente esposto, che si attiva a seguito della rottura *double strand* del DNA. TNKS è un regolatore positivo di questo pathway, in quanto aggiungendo gruppi ADP-ribosio sulla subunità calatica del pathway, ne induce una maggiore stabilità [100]. L'inibizione di TNKS, quindi, dovrebbe

comportare una minore efficacia nel riparare il danno alla doppia elica del DNA, indotto dalle RI.

Per studiare specificatamente questo aspetto, abbiamo utilizzato il *Comet Assay*, o gel-elettroforesi su singola cellula. Questo saggio può essere condotto in due modalità: in condizioni alcaline (*Alkaline Comet Assay*) o in condizioni neutre (*Neutral Comet Assay*). La prima modalità permette di evidenziare ogni tipo di danno citotossico al DNA (sia SSBs che DSBs), la seconda modalità, che è quella da noi utilizzata, permette di analizzare selettivamente i danni alla doppia elica i DSBs [106].

Le cellule, a seguito dei vari trattamenti, vengono risospese in agar, lisate e sottoposte a corsa elettroforetica. Il DNA danneggiato migrerà formando per ogni spot cellulare una “coda”. L’immagine che ne risulta, per ogni cellula, è quella di una vera e propria cometa, con una “testa”, composta dal DNA che non ha migrato, e dalla coda (Fig. 12). Maggiore è la coda che si viene a creare e maggiore sarà il danno al DNA subito da quella cellula. Le cellule vengono infine trattate con un intercalante del DNA che consente la visualizzazione delle comete. L’unità di misura più comunemente utilizzata per quantificare il danno genotossico in questo tipo di indagine è il “momento di coda” o “*Tail Moment*” (TM) che tiene conto allo stesso tempo della lunghezza delle code e dell’intensità delle stesse (indice di una maggiore frammentazione del DNA e quindi di un maggior danno). Tanto più alto è il TM, tanto maggiore sarà il danno inferto al genoma.

L’acqua ossigenata è stata utilizzata come controllo negativo (alla concentrazione di 10 μ M per un tempo massimo di 15 minuti). È infatti riportato in letteratura, che alla concentrazione e per il tempo indicati, l’acqua ossigenata induce esclusivamente SSBs [106].

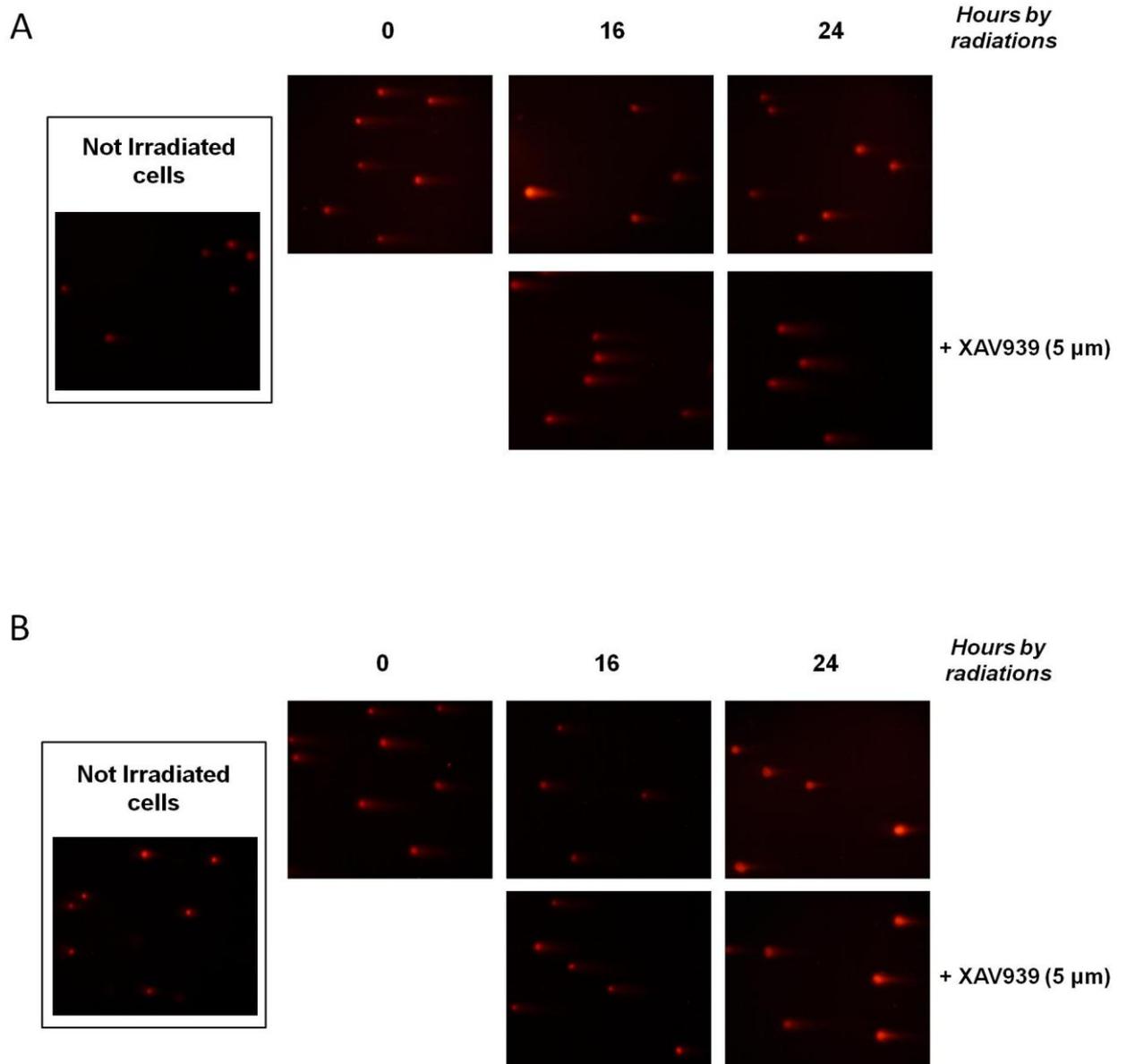


Fig. 12. Immagini delle comete ottenute tramite Neutral Comet Assay sulle ONS-76 (A) e DAOY (B), a vari tempi dalle RI (0, 16 e 24 ore, 10 Gy) con o senza il pre-trattamento con XAV939; cellule non irradiate mostrano una coda molto minore rispetto a cellule trattate con radiazioni. Le cellule, a seguito dei trattamenti, vengono risospese in agar, coattate su un vetrino, lisate e sottoposte a corsa elettroforetica. I vetrini vengono colorati per evidenziare il DNA, la lunghezza delle code che si ottengono a seguito della corsa è direttamente proporzionali al danno inferto al DNA dal trattamento

Abbiamo innanzitutto valutato “la cinetica di riparo” delle nostre linee cellulari, ovvero abbiamo misurato il TM, e quindi il danno al DNA, in time point successivi a seguito del trattamento con le RI. In figura 13, si può notare che,

come atteso, il maggiore TM rilevato (in entrambe le linee) è stato riscontrato subito dopo il trattamento con le RI (tempo zero dalle RI). Nel time point successivo (16 ore dalle radiazioni), il TM subisce un forte calo e 24 ore dal danno genotossico era pari a quello di cellule di controllo non irradiate, indice di una avvenuta e corretta riparazione del danno al genoma. Inoltre, il TM del controllo negativo, non è in nessun caso significativamente maggiore di quello del controllo non irradiato, confermando la validità del metodo utilizzato.

Cellule trattate con XAV939 (5 μ M) e successivamente irradiate presentano invece un notevole ritardo nella riparazione dei DSBs. La cinetica di riparo di queste cellule presenta un andamento molto diverso da quello di cellule irradiate ma non trattate con la molecola: a parità di time point considerato, possiamo infatti riscontrare nelle cellule trattate con XAV939 un valore di TM nettamente più elevato.

Nelle DAOY, 16 ore dopo il trattamento con RI, il TM riscontrato era paragonabile a quello di cellule appena irradiate e a 24 ore dalle RI, abbiamo registrato un valore di TM doppio rispetto a quello di cellule non trattate con la molecola.

Nelle ONS-76, a 16 ore dal trattamento con le radiazioni, il TM di cellule precedentemente trattate con XAV939 è risultato quasi il doppio del TM di cellule non trattate con il farmaco allo stesso time point, mentre era comunque superiore del 30% a 24 ore dalle RI.

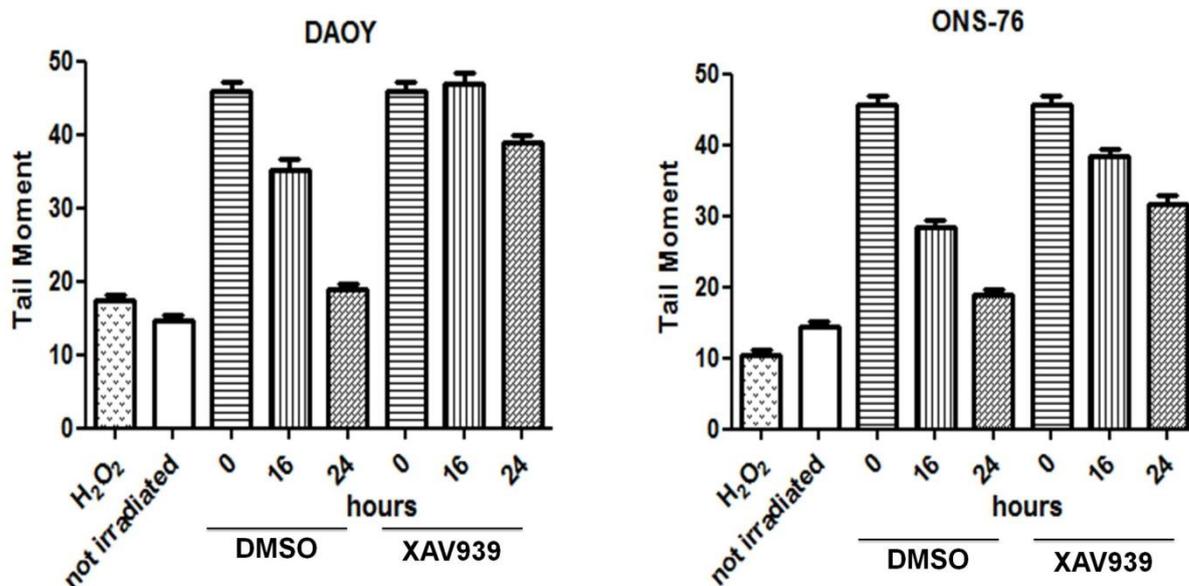


Fig. 13. Analisi del Tail Moment a seguito dei vari trattamenti nelle due linee cellulari, calcolato mediante software Casp su circa 100 comete per trattamento, in triplicato. Il minor TM si riscontra in cellule non irradiate e in cellule trattate con acqua ossigenata. Il maggior TM è stato rilevato subito dopo le radiazioni (0); a 16 e 24 ore dopo le RI (in cellule pre-trattate con DMSO) si assiste una diminuzione del TM. Cellule trattate con XAV939 presentano invece un evidente ritardo nella capacità di riparare il danno al DNA

Questi dati testimoniano che ad una inibizione farmacologica di TNKS corrisponde nelle cellule ad una evidente minore efficacia nel riparare il danno indotto dalle RI alla doppia elica del DNA.

L'inibizione farmacologica di TNKS induce una maggiore mortalità cellulare in cellule trattate con RI

Mediante il saggio di esclusione in trypan blu o *trypan blu exclusion assay*, abbiamo verificato se all'inibizione della capacità proliferativa e clonogenica, nonché ad una minore risposta al danno inferto dalle RI al DNA, corrispondesse una maggiore mortalità cellulare, indice di una aumentata radiosensibilità.

Prevedibilmente, il trattamento con le RI induce una maggiore mortalità cellulare. Nelle DAOY, la dose da noi presa come riferimento (2 Gy) ha indotto un aumento della mortalità cellulare rispetto al controllo del 16.81% (48 ore dopo il trattamento), 10.9% (a 72 ore) e del 9.3% (a 96 ore). Cellule trattate con XAV939 (5 μ M) hanno mostrato a seguito dell'esposizione alle radiazioni, una maggiore mortalità cellulare, ovvero del 23.5%, 17% e 13% in più in confronto a cellule di controllo non trattate (rispettivamente nei time point 48, 72 e 96 ore). L'aumento, rispetto a cellule irradiate non trattate con la molecola, è stato rispettivamente del 6.77%, 6.1% e 3.7%, con una differenza giudicata statisticamente significativa a 72 e 96 ore dalle RI ($p < 0.01$ e $p < 0.05$ rispettivamente, one-way ANOVA). Nelle ONS-76, agli stessi time point precedentemente indicati, riscontriamo una mortalità del 10.61%, 9.11% e 10.43% a seguito di 2 Gy di RI. XAV939 induce anche per questa linea cellulare un aumento della mortalità indotta da radiazioni, ma meno accentuato di quello riscontrato nelle DAOY: 12.93%, 13.49% e 13.23% rispetto al controllo non irradiato, con un aumento del 2.35%, 4.38% e 2.8% in confronto a cellule irradiate ma non trattate con la molecola. Anche in questo caso, l'analisi statistica è risultata comunque significativa a 72 e 96 ore dalle RI ($p < 0.01$ e $p < 0.05$ rispettivamente, one-way ANOVA). Questi risultati, su entrambe le linee cellulari sono sintetizzati in Fig. 14.

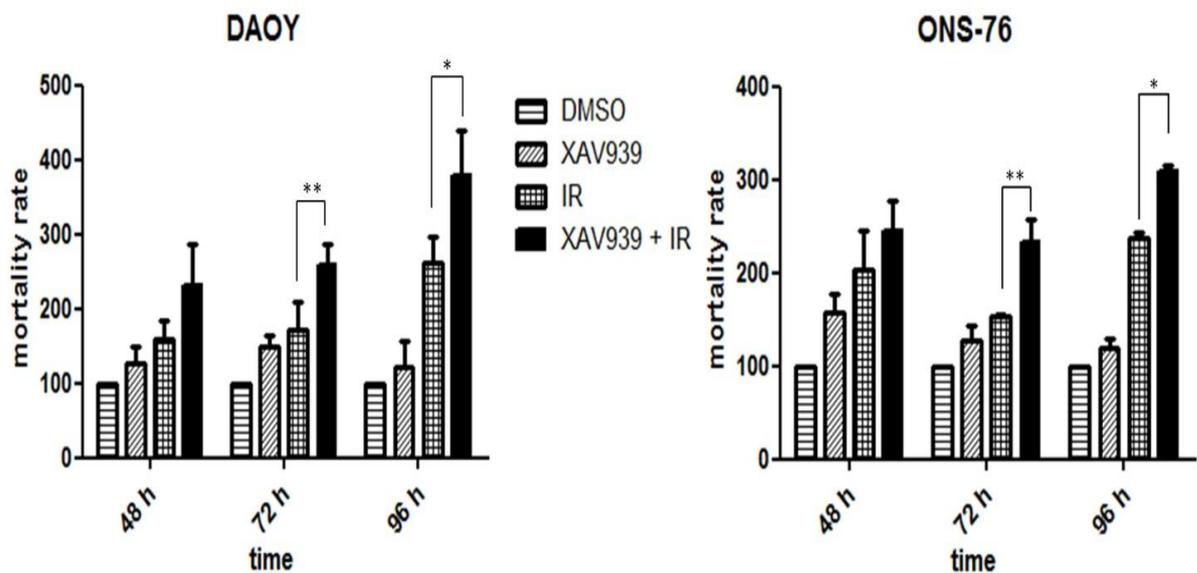


Fig. 14. Mortalità cellulare in differenti time point (48, 72 e 96 ore), espressa come percentuale rispetto al controllo trattato con DMSO, a seguito dei vari trattamenti (XAV939, IR e co-trattamento). Le RI inducono prevedibilmente un aumento del tasso di mortalità; la maggiore mortalità è in ogni caso associata al co-trattamento, mentre XAV939 non incide mai in modo significativo

A prescindere da questi dati però, non abbiamo mai riscontrato un aumento nella mortalità cellulare a seguito del co-trattamento con XAV939 e RI, congruo ai risultati ottenuti per la capacità proliferativa e clonogenica. Abbiamo allora ipotizzato che una singola dose da 2 Gy, sufficiente nel co-trattamento con XAV939 ad incidere in maniera consistente sulla proliferazione e sulla clonogenicità, non fosse invece sufficiente a causare un aumento altrettanto significativo della mortalità cellulare. Per questo motivo, cercando di non discostarci da questa dose, abbiamo pensato di irradiare le cellule con due dosi successive di RI da 2 Gy.

Cellule trattate con XAV939 e sottoposte a due dosi successive di RI da 2 Gy hanno così manifestato una minore resistenza alle radiazioni. In particolare, nelle ONS-76, abbiamo riscontrato un tasso di mortalità cellulare pari al 17.75% nelle cellule che hanno subito un co-trattamento di XAV939 e una doppia dose di RI, in confronto al 9.8% delle cellule di controllo irradiate allo stesso modo

ma non trattate con la molecola ($p < 0.001$, one-way ANOVA). Parallelamente, abbiamo evidenziato nelle DAOY una mortalità cellulare doppia in cellule trattate con XAV939 e irradiate come descritto rispetto al controllo irradiato ma non trattato con la molecola (30.95% contro 16.17%, $p < 0.001$, one-way ANOVA) (Fig. 15).

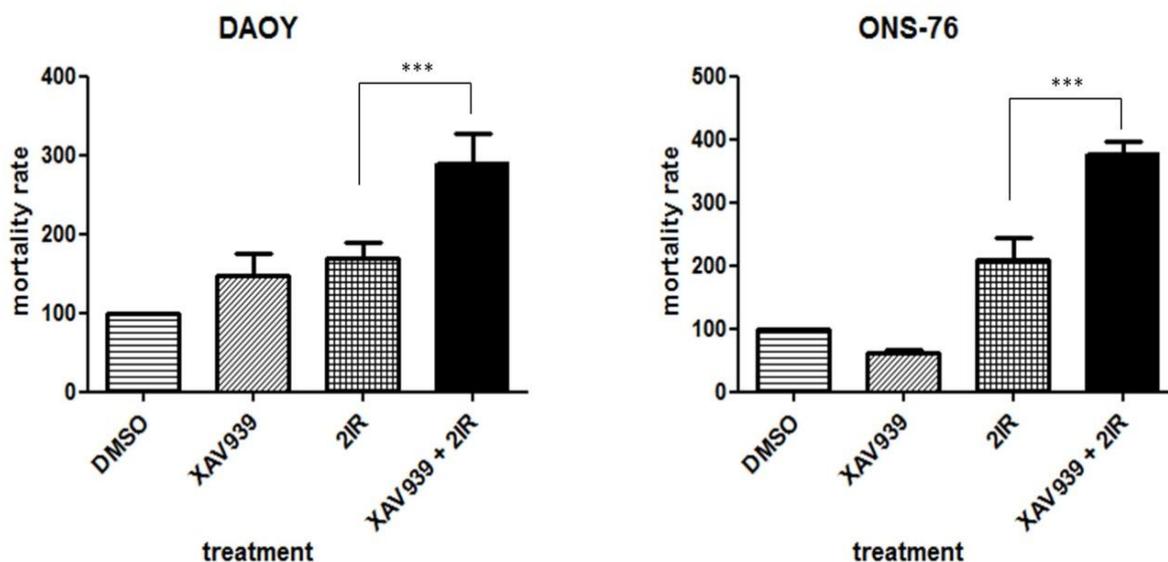


Fig.15. Mortalità cellulare a seguito del trattamento con DMSO e due dosi successive da 2 Gy di RI (2IR, in figura) oppure a seguito del trattamento con XAV939 e due dosi da 2 Gy (XAV939 + 2IR, in figura). Il tasso di mortalità è espresso come percentuale rispetto al controllo non irradiato (DMSO)

È importante sottolineare, infine, che in nessun caso abbiamo riscontrato un aumento significativo della mortalità cellulare nei campioni trattati con XAV939 e non irradiati rispetto ai controlli trattati con DMSO, in tutti i time point considerati.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni si è riscontrato un crescente interesse per le proteine appartenenti alla famiglia delle PARP, in virtù del ruolo centrale che esse svolgono nell'attivazione dei meccanismi di riparo del DNA. In letteratura, si possono ritrovare numerosi lavori che trattano le potenzialità in ambito oncologico e in *target therapy* di specifici PARP-inibitori. Sono sempre di più, infatti, i composti sintetizzati e testati come potenziali inibitori di queste proteine, al fine di ottenere possibili “sensibilizzatori” al danno genotossico inferto dagli attuali chemioterapici o dalle radiazioni ionizzanti utilizzate in radioterapia [107]. Alcuni di essi sono già sottoposti a *trial clinici*, quindi a sperimentazione sull'uomo [108], e in diversi casi, sono molecole inserite in studi di fase III che coinvolgono un numero certamente elevato di pazienti oncologici.

Ad oggi, l'enzima più studiato tra tutti i membri della famiglia delle PARP è sicuramente PARP-1. Per questo motivo, la totalità degli studi in fase clinica riguarda specifici inibitori di tale enzima.

Dregalla e collaborati, in un lavoro pubblicato nel 2010 sulla rivista *Aging*, hanno tuttavia messo in luce le potenzialità terapeutiche di un altro membro di questa famiglia di enzimi: PARP-5, o Tanchirasi [100]. L'interesse clinico per questa proteina nasce dal fatto che è un fondamentale regolatore del pathway DNA-PK e, di conseguenza, del meccanismo di riparo del danno al DNA definito “saldatura non omologa delle estremità”, o *Non homologous end-joining* (NHEJ). L'NHEJ, assieme all'HR (*Homologous Re-joining*, ovvero saldatura omologa delle estremità) è il principale meccanismo che si attiva selettivamente a seguito della frattura della doppia elica del DNA. Tra i due meccanismi è sicuramente il meno “specifico” in quanto, come suggerisce l'acronimo, provvede a riparare la rottura senza tener conto della eventuale omologia delle estremità del DNA danneggiato. Ma è allo stesso tempo più rapido, ed infatti è il

primo meccanismo ad attivarsi, in quanto assicura una, seppur minima, stabilità genomica alla cellula che deve far fronte ad un forte danno genotossico come può essere quello inferto dalle RI. Le radiazioni sono particolarmente letali ed efficaci in terapia proprio perché sono la causa maggiore della formazione di DSBs.

L'inibizione di TNKS, destabilizzando un pathway chiave nel riparo dei DSBs, rende potenzialmente le cellule più suscettibili alle RI.

D'altra parte è stata anche sottolineata la stretta connessione tra questo enzima e il pathway WNT/ β -catenina. TNKS è infatti un regolatore negativo di axina e di conseguenza un regolatore positivo del pathway: in altri termini, inibire TNKS induce anche una inibizione del pathway di β -catenina [99].

Molti studi nel corso degli anni hanno fatto luce sull'importanza del signalling di WNT nel MB, ma solo di recente è stata testata l'efficacia di una terapia finalizzata all'inibizione di questo pathway. Zollo *et al.* hanno evidenziato, ad esempio, l'efficacia di diversi inibitori di WNT nel MB sia *in vitro* che *in vivo*, riscontrando una forte diminuzione della proliferazione cellulare, seguita da apoptosi [109]. Risultati analoghi sono stati ottenuti da Baryawno e collaboratori, in uno studio del 2009 in cui si evidenzia che l'inibizione specifica del pathway Akt induce anche l'inibizione del pathway WNT mediata da Gsk3- β , e a questo consegue, in linee cellulari di MB, una consistente inibizione della capacità proliferativa, ancora una volta associata ad apoptosi [110]. Questi risultati sono stati poi confermati anche *in vivo*.

Nel nostro studio *in vitro*, abbiamo evidenziato invece come l'inibizione di TNKS medi l'inibizione del pathway WNT e comporti anche nel nostro caso una consistente diminuzione della proliferazione cellulare (comparabile a quella dovuta al trattamento con una dose da 2 Gy di RI), ma non induce un consecutivo aumento della mortalità, indicando, più che altro, una bassa tossicità associata alla small molecule XAV939 da noi utilizzata in questi esperimenti.

Da questo punto di vista, al più, l'inibizione di TNKS avrebbe dovuto comportare un arresto mitotico, visto anche il forte coinvolgimento dell'enzima nella regolazione del telomeri durante la mitosi. Ma già diversi studi hanno evidenziato che la deplezione di TNKS, farmacologica o per mezzo di siRNA, non ha come conseguenza l'arresto mitotico, portando ad ipotizzare la possibile presenza di altri meccanismi compensatori [99].

La nostra valutazione della mortalità cellulare è, in ogni caso, in accordo con quanto riscontrato da altri autori.

Il più importante dato sulla capacità proliferativa da noi ottenuto è quello a seguito del co-trattamento di RI e XAV939. In questi esperimenti abbiamo scelto di utilizzare come riferimento la dose da 2 Gy, in quanto essa corrisponde alla frazione giornaliera (su un totale di 34-36 Gy di RI) che normalmente viene somministrata nella pratica clinica per il MB.

A questa minima dose di RI, abbiamo riscontrato che XAV939 induce una forte inibizione della proliferazione cellulare, maggiore di quella riscontrata a seguito del trattamento con la sola molecola o con le sole RI. Questo risultato fa ipotizzare un aumento della radiosensibilità indotto dall'inibizione di TNKS: il *growth curves assay* è difatti considerato un valido saggio per definire la suscettibilità alle radiazioni in quanto fornisce informazioni sulla effettiva capacità proliferativa di cellule che resistono al trattamento con RI [111].

Se la comparazione delle curve di crescita è considerato un buon metodo di indagine per evidenziare una maggiore radiosensibilità indotta da un determinato trattamento, il *Colony Forming Assay* è definito, da questo punto di vista, il *gold standard* [112]. Tramite questo saggio, nel nostro lavoro, abbiamo evidenziato come il trattamento congiunto di XAV939 e RI comporti una massiccia inibizione della capacità clonogenica, riscontrando peraltro un andamento del tutto analogo a quello rilevato sulla proliferazione cellulare: un'inibizione della clonogenicità, rispetto al controllo non trattato, simile tra

campioni trattati con XAV939 e campioni trattati con RI, e una forte riduzione associata invece al co-trattamento.

La riduzione della frazione sopravvivenza a 2 Gy, o SF2, è una ulteriore conferma dei nostri dati: indica cioè una effettiva maggiore radiosensibilità delle cellule di MB, indotta dalla inibizione di TNKS.

Per verificare che a quanto detto si associasse anche una minore efficacia nel riparo del danno *double strand* al DNA, abbiamo messo a punto, sulle nostre linee cellulari, il *Neutral Comet Assay*. Questo saggio è considerato un metodo rapido e semplice per visualizzare e soprattutto quantificare il danno cellulare inferto al DNA da qualunque agente genotossico [106, 113].

In condizioni neutre il saggio è settato per evidenziare esclusivamente DSBs [106]. Tuttavia, la versione neutra del saggio, contrariamente all'Alkaline Comet Assay, richiede una messa a punto *ad hoc* per ottenere la migliore sensibilità possibile [114]. Olive e collaboratori, tra i primi ad utilizzare questa tecnica, pensarono che un buon metodo per aumentare la sensibilità del saggio fosse quella di apportare delle modifiche sostanziali al protocollo comunemente utilizzato nel Comet Assay, aumentando il tempo di lisi a cui sono sottoposte le cellule a seguito dei trattamenti e aumentando la temperatura di incubazione a 50°C [115, 116, 117]. Seguendo questi accorgimenti è stato dimostrato che vi è una relazione lineare tra TM, che come abbiamo detto è l'unità di misura del danno al DNA, e dose di radiazioni in un *range* che va da 5 a 300 Gy [114].

L'uso di temperature di lisi troppo alte può però incidere negativamente sulla corretta valutazione dei DSBs. Una temperatura troppo alta infatti induce in cellule irradiate la presenza di un numero maggiore di DSB, come suggerito da Rydberg *et al.*[118]. Rende quindi poco attendibile il metodo in quanto non si può affermare con certezza se il valore di TM riscontrato sia dovuto all'efficacia di un trattamento o più che altro al protocollo di lisi. Per questo motivo, è stato suggerito da diversi autori un protocollo alternativo che evita l'utilizzo di

temperature di lisi eccessivamente alte. In questo caso, però, si ha un rapporto lineare tra dose di radiazione e TM in un range che va dai 10 ai 100 Gy [114].

Nei nostri esperimenti abbiamo sfruttato quindi quest'ultima versione del Neutral Comet Assay che permetteva di evitare l'utilizzo di temperatura troppo alte: secondo questa variante, la dose di radiazione da 10 Gy è quella che consente la maggiore attendibilità del saggio [114]. In questo caso era comunque nostro unico interesse evidenziare in che misura XAV939 comportasse una minore efficacia nel riparare il danno inferto dalle RI al DNA.

Come detto nel paragrafo dei risultati dedicato al Comet Assay, la cinetica del riparo del DNA da noi riscontrata vedeva un picco del TM subito dopo le radiazioni e una sua lenta diminuzione nelle ore successive: 24 ore dopo il trattamento con RI abbiamo così riscontrato un valore di TM paragonabile a quello di cellule non irradiate, confermando una corretta riparazione del DNA. Quest'andamento è in accordo con i dati pubblicati in numerosi altri studi [106, 114, 115, 116, 117, 119, 120]. In uno di essi si evidenzia come, in generale, il riparo dei DSBs si esaurisse in linee cellulari di mammifero in non più di 20 ore, confermando quanto da noi ottenuto [121, 122].

È inoltre riportato in letteratura che il danno misurato dopo più di 4 ore dalle RI è un eccellente indice della capacità cellulare di riparare il proprio genoma [123]. L'alto valore di TM da noi riscontrato, quindi, nelle cellule di MB trattate con XAV939, in time point così tardivi dalle RI (16 e 24 ore), supporta fortemente la tesi di una minore efficacia dei meccanismi di riparo dei DSBs, associata ad una inibizione farmacologica di TNKS.

L'aumento della mortalità cellulare dovuto al trattamento farmacologico con XAV939, a seguito di una dose di RI da 2 Gy e, a maggior veduta in seguito ad una doppia dose di radiazioni, in relazione alla bassa tossicità della molecola, conferma definitivamente una aumentata suscettibilità alle RI delle cellule di MB trattate con XAV939.

Il nostro studio fornisce, per la prima volta, dati sulle potenzialità terapeutiche dell'inibizione di TNKS nel MB. Il trattamento con XAV939, specifico e potente inibitore dell'attività PARsilasica di TNKS, induce inibizione dei pathway WNT e DNA-PK e, a questo, si associa una maggiore radiosensibilità di cellule di MB. I nostri risultati pongono le basi per successivi studi *in vivo*, che portino al disegno di trial clinici focalizzati su di una combinazione di inibitori di TNKS e la radioterapia convenzionale. Potenzialmente, questo potrebbe portare ad una terapia più efficace e/o meno invasiva per i pazienti, in quanto un utilizzo minore di RI comporterà sicuramente minori effetti collaterali.

BIBLIOGRAFIA

1. Eberhart CG, Kepner JL, Goldthwaite PT, Kun LE, Duffner PK, Friedman HS, Strother DR, Burger PC. *Histopathologic grading of medulloblastomas: a pediatric oncology group study*. Cancer; 94, 552-560, 2002.
2. Kleihues P, Luois DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. J. Neuropath Exp. Neurol; 61, 215-225, 2002.
3. Ellison D. *Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics*. Neuropath Appl Neurobiol; 28, 257-282, 2002.
4. Gilbertson RJ. *Medulloblastoma: signaling a change in treatment*. Lancet Oncol; 5: 209-218, 2004.
5. Taylor MD, Mainprize TG, Rutka JT. *Molecular insight into medulloblastoma and central nervous system primitive neuroectodermal tumor biology from hereditary syndromes*. Review Neurosurgery; 47, 888-901, 2000.
6. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B. *The molecular basis of Turcot's syndrome*. N Engl J Med; 332, 839-847, 1995.
7. Frange P, Alapetite C, Gaboriaud G, Bours D, Zucker JM, Zerah M, Brisse H, Chevignard M, Mosseri V, Bouffet E, Doz F. *From childhood to adulthood: long-term outcome of medulloblastoma patients. The Institut Curie experience(1980-2000)*. J Neurooncol; 95, 271-279, 2009.
8. Saury JM, Emanuelson I. *Cognitive consequences of the treatment of medulloblastoma among children*. Pediatr Neurol; 44, 21-30, 2011.
9. Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturua LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JYH, Goumnerova LC, Black PM, Lau C, Allen JC, Zigzag D, Olson JM, Curran T, Wetmore C, Blegel JA, Poggio T, Mukherjee S, Rifkin R, Califano A, Stolovitzky G, Louis D, Mesirov JP, Lander ES, Golub TR. *Prediction of central nervous system embryonal tumor outcome based on gene expression*. Nature; 415, 436-442, 2002.
10. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol; 114, 97-109, 2007.

-
11. McManamy CS, Lamont JM, Taylor RE, Cole M, Pearson AD, Clifford SC, Ellison DW. *Morphophenotypic variation predicts clinical behavior in childhood non-desmoplastic medulloblastomas*. *J Neuropathol Exp Neurol*; 62, 627-632, 2003.
12. Giangaspero F, Rigobello L, Badiali M, Loda M, Andreini L, Basso G, Zorzi F, Montaldi A. *Large-cell medulloblastomas. A distinct variant with highly aggressive behavior*. *Am J Surg Pathol*; 16, 687-693, 1992.
13. Gilbertson RJ, Jaros E, Perry RH, Kelly PJ, Lunec J, Pearson AD. *Mitotic percentage index: a new prognostic factor for childhood medulloblastoma*. *Eur J Cancer*; 33, 609-615, 1997.
14. Giangaspero F, Perilongo G, Fondelli MP, Brisigotti M, Carollo C, Burnelli R, Burger PC, Garre ML. *Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant with favorable prognosis*. *J Neurosurg*; 91, 971-977, 1999.
15. Gilbertson RJ, Ellison DW. *The origins of medulloblastoma subtypes*. *Annu Rev Pathol*; 3, 341-365, 2008.
16. Giangaspero F, Wellek S, Masuoka J, Gessi M, Kleihues P, Ohgaki H. *Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading*. *Acta Neuropathol*; 112, 5-12, 2006.
17. Lamont JM, McManamy CS, Pearson AD, Clifford S, Ellison DW. *Combined histopathological and molecular cytogenetic stratification of medulloblastoma patients*. *Clin Cancer Res*; 10, 5482-5493, 2004.
18. Eberhart CG, Kratz JE, Schuster A, Goldthwaite P, Cohen KJ, Perlman EJ, Burger PC. *Comparative genomic hybridization detects an increased number of chromosomal alterations in large cell/anaplastic medulloblastomas*. *Brain Pathol*; 12, 36-44, 2002.
19. Frank AJ, Hernan R, Hollander A, Lindsev JC, Lusher ME, Fuller CE, Clifford SC, Gilbertson RJ. *The *tp53-Arf* tumor suppressor pathway is frequently disrupted in large/cell anaplastic medulloblastoma*. *Brain Res Mol Brain Res*; 121, 137-140, 2004.
20. Pietsch T, Taylor MD, Rutka J. *Molecular pathogenesis of childhood brain tumors*. *J Neurooncol*; 70, 203-215, 2004.
21. Eberhart CG, Kratz J, Wang Y, Summers K, Stearns D, Cohen K, Dang CV, Burger PC. *Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: *c-myc*, *N-myc*, *TrkC*, and anaplasia*. *J Neuropathol Exp Neurol*; 63, 441-449, 2004.
22. MacDonald TJ, Brown KM, LaFleur B, Peterson K, Lawlor C, Chen Y, Packer RJ, Cogen P, Stephan DA. *Expression profiling of medulloblastoma: *PDGFRA* and the*

RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. Nat Genet; 29, 143-152, 2011.

23. Herms J, Neidt I, Luscher B, Sommer A, Schurmann P, Schroder T, Bergmann M, Wilken B, Probst-Cousin S, Hernaiz-Driever P, Behnke J, Hanefeld F, Pietsch T, Kretzschmar HA. *C-MYC expression in medulloblastoma and its prognostic value. Int J Cancer; 89, 395-402, 2000.*

24. Pan E, Pellarin M, Holmes E, Smirnov I, Misra A, Eberhart CG, Burger PC, Biegel JA, Feuerstein BG. *Isochromosome 17q is a negative prognostic factor in poor-risk childhood medulloblastoma patients. Clin Cancer Res; 11, 4733-4740, 2005.*

25. Batra SK, McLendon RE, Koo JS, Castelino-Prabhu S, Fuchs HE, Krischer P, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH. *Prognostic implications of chromosome 17p deletions in human medulloblastomas. J Neurooncol; 24, 39-45, 1995.*

26. Tabori U, Baskin B, Shago M, Alon N, Taylor MD, Ray PN, Bouffet E, Malkin D, Hawkins C. *Universal poor survival in children with medulloblastoma harboring somatic TP53 mutations. J Clin Oncol; 28, 1345-1350, 2010.*

27. Eberhart CG, Chaudhry A, Daniel RW, Khaki L, Shah KV, Gravitt PE. *Increased p53 immunopositivity in anaplastic medulloblastoma and supratentorial PNET is not caused by JC virus. BMC Cancer; 5, 19, 2009.*

28. Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, Stiles CD, Pomeroy SL. *Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A; 91, 12867-12871, 1994.*

29. Rutkowski S, von BA, von HK, Hartmann W, Shalaby T, Deinlein F, Warmuth-Metz M, Soerensen N, Emser A, Bode U, Mittler U, Urban C, Benesch M, Kortmann RD, Schlegel PG, Kuehl J, Pietsch T, Grotzer M. *Prognostic relevance of clinical and biological risk factors in childhood medulloblastoma: results of patients treated in the prospective multicenter trial HIT'91. Clin Cancer Res; 13, 2651-2657, 2007.*

30. Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, Lusher ME, Weston CL, Taylor RE, Pearson AD, Clifford SC. *Beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. J Clin Oncol; 23, 7951-7957, 2005.*

31. Fattet S, Haberler C, Legoix P, Varlet P, Lellouch-Tubiana A, Lair S, Manie E, Raquin MA, Bours D, Carpentier S, Barillot E, Grill J, Doz F, Puget S, Janoueix-Lerosey I, Delattre O. *Beta-catenin status in paediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. J Pathol; 218, 86-94, 2009.*

-
32. Jozwiak J, Grajkowska W, Wlodarski P. *Pathogenesis of medulloblastoma and current treatment outlook*. Med Res Rev; 1-17, 2006.
33. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher Eberhart G, Mack S, Bouffet E, Clifford S, Hawkins C, French C, Rutka J, Pfister S and Taylor M. *Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants*. JCO; 19, 1408–1414, 2011
34. Wechsler-Reya R, Scott MP. *The developmental biology of brain tumors*. Annu Rev Neuroscience; 24, 385-428, 2001.
35. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, et al. *Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome*. Cell; 85, 841–51, 1996.
36. Taipale J, Beachy PA. *The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer*. Nature; 411, 349–54, 2001.
37. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. *Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling*. Curr Top Dev Biol; 53, 1–114, 2003.
38. Ruiz I, Altaba A, Sanchez P, Dahmane N. *Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells*. Nat Rev Cancer; 2, 361–72, 2002
39. Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. *Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched*. Cancer Res; 61, 513–16, 2001.
40. Yarden Y, Sliwkowski MX. *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol; 2, 127–37, 2001.
41. Gilbertson RJ, Perry RH, Kelly PJ, et al. *Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma*. Cancer Res; 57, 3272–80, 1997.
42. Gajjar A, Hernan R, Kocak M, et al. *Clinical, histopathological and molecular markers of prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma*. JCO; 22, 984–993, 2004.
43. Zhou BP, Liao Y, Xia W, et al. *HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation*. Nat Cell Biol; 3, 973–82, 2001.
44. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, et al. *HER2 (neu) signalling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression*. Mol Cell Biol; 21, 3995–4004, 2001.

-
45. Marino S. *Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control*. Trends in Mol Med; 11, 17-22, 2005.
46. Damalas A, Kahan S, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Oren M (2001) *Deregulated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation*. EMBO J; 20, 4912-4922
47. Shakhova O, Leung C, van ME, Berns A, Marino S. *Lack of Rb and p53 delays cerebellar development and predisposes to large cell anaplastic medulloblastoma through amplification of N-Myc and Ptch2*. Cancer Res; 66, 5190-5200, 2006.
48. Ray A, Ho M, Ma J, Parkes RK, Mainprize TG, Ueda S, McLaughlin J, Bouffet E, Rutka JT, Hawkins CE. *A clinicobiological model predicting survival in medulloblastoma*. Clin Cancer Res; 10, 7613-7620, 2004.
49. Koch A, Waha A, Tonn JC. *Somatic mutation of Wnt/Wingless pathway components in primitive neuroectodermal tumours*. Int J Cancer; 93, 445-449, 2001
50. Miller JR *The Wnts*. Genome Biol; 3, 2002.
51. Cadigan KM, Liu YI. *Wnt signaling: complexity at the surface*. J. Cell Sci; 119, 395-402, 2006
52. Stadel R, Hoffmans R, Basler K. *Transcription under the control of nuclear Arm/ β -catenin*. Curr Biol; 16, R378-R385, 2006
53. Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC(-/-) colon carcinoma*. Science; 275, 1784-1787, 1997.
54. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. *Activation of betacatenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in betacatenin or APC*. Science; 275, 1787-1790, 1997.
55. Nakamura Y. *The role of the adenomatous polyposis-coli (Apc) gene in human cancers*. Adv Cancer Res; 62, 65-87, 1993.
56. Gudkov AV, Komarova EA. *The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy*. Nat Rev Cancer; 3, 117-129, 2003.
57. Willers H, Dahm-Daphi J, Powell SN. *Repair of radiation damage to DNA*. Br J Cancer; 9, 1297-1301, 2004
58. Parilla-Castellar ER, Arlander SJ, Karnitz L. *Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex*. DNA Repair; 3, 1009-1014, 2004.

-
59. Mochan TA, Venere M, DiTullio RA Jr, Halazonetis TD. *53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage*. DNA Repair; 3, 945-952, 2004.
60. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo*. J. Cell Biol; 146, 905-916, 1999.
61. Zhou BB, Elledge SJ. *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature; 408, 433-439, 2000
62. Perry ME. *MDM2 in response to radiation*. Mol Cancer Res; 2, 9-19, 2004.
63. Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M. *ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage*. Genes Dev; 15, 1067-1077, 2001
64. Khanna KK and Jackson SP. *DNA double-strand breaks: signalling, repair and the cancer connection*. Nature Genet; 27, 247-254, 2001
65. Yang H, Jeffrey P, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma N, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich N. *BRCA2 Function in DNA Binding and Recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA Structure*. Science; 297, 1837-1848, 2002.
66. Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, van Gent DC, Shiraishi T, Verkaik NS, van Heems D, Ito E, Nakamura A, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Matsuura S, Komatsu K *Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells*. Nature; 420, 93-98, 2002.
67. Brat DJ, Parisi JE, Kleinschmidt-DeMasters BK, Yachnis AT, Montine TJ, Boyer PJ, Powell SZ, Prayson RA, McLendon RE. *Surgical neuropathology update: a review of changes introduced by the WHO classification of tumours of the central nervous system, 4th edition*. Arch Pathol Lab Med; 132, 993-1007, 2008
68. Rutkowski S, Bode U, Deinlein F, Ottensmeier H, Warmuth-Metz M, Soerensen. N, Graf N, Emser A, Pietsch T, Wolff JE, Kortmann RD, Kuehl J. *Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone*. N Engl J Med; 352, 978-986, 2005.
69. Kortmann RD, Kuhl J, Timmermann B, Mittler U, Urban C, Budach V, Richter E, Willich N, Flentje M, Berthold F, Slavic I, Wolff J, Meisner C, Wiestler O, Sørensen N, Warmuth-Metz M, Bamberg M. *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, 2000

70. Taylor RE, Bailey CC, Robinson K, Weston CL, Ellison D, Ironside J, Lucraft H, Gilbertson R, Tait DM, Walker DA, Pizer BL, Imeson J, Lashford LS. *Results of a randomized study of preradiation chemotherapy versus radiotherapy alone for nonmetastatic medulloblastoma: the International Society of Paediatric Oncology/UK Children's Cancer Study Group PNET-3 Study. J Clin Oncol; 21, 1581–91, 2003.*

71. Strother D, Ashley D, Kellie SJ, Patel A, Jones-Wallace D, Thompson S, Heideman R, Benaim E, Krance R, Bowman L, Gajjar A. *Feasibility of four consecutive high-dose chemotherapy cycles with stem-cell rescue for patients with newly diagnosed medulloblastoma or supratentorial primitive neuroectodermal tumor after craniospinal radiotherapy: results of a collaborative study. J Clin Oncol; 19, 2696–704, 2001.*

72. Packer RJ, Goldwein J, Nicholson HS, Vezina LG, Allen JC, Ris MD, Muraszko K, Rorke LB, Wara WM, Cohen BH, Boyett JM. *Treatment of children with medulloblastomas with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: a Children's Cancer Group Study. J Clin Oncol; 17, 2127–36, 1999.*

73. Thomas PR, Deutsch M, Kepner JL, Boyett JM, Krischer J, Aronin P, Albright L, Allen JC, Packer RJ, Linggood R, Mulhern R, Stehbens JA, Langston J, Stanley P, Duffner P, Rorke L, Cherlow J, Friedman HS, Finlay JL, Vietti TJ, Kun LE. *Low-stage medulloblastoma: final analysis of trial comparing standard-dose with reduced-dose neuraxis irradiation. J Clin Oncol; 18, 3004–11, 2001.*

74. Ris MD, Packer R, Goldwein J, Jones-Wallace D, Boyett JM. *Intellectual outcome after reduced-dose radiation therapy plus adjuvant chemotherapy for medulloblastoma: a Children's Cancer Group study. J Clin Oncol; 19, 3470–76, 2001*

75. Han-Chung W, De-Kuan C, Chia-Ting H. *Targeted Therapy for Cancer. J. Cancer Mol; 2, 57-66, 2006*

76. Kohler G, Milstein C. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature; 256, 495-497, 1975.*

77. Peralta-Leal A, Rodríguez-Vargas JM, Aguilar-Quesada R, Rodríguez MI, Linares JL, de Almodóvar MR, Oliver FJ. *PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. Biol Med; 47,13-26, 2009*

78. Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. *Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? Microbiol. Mol. Biol. Rev; 70, 789–829, 2006.*

-
79. Chiang YJ, Hsiao SJ, Yver D, Cushman SW, Tessarollo L, Smith S, Hodes RJ. *Tankyrase 1 and tankyrase 2 are essential but redundant for mouse embryonic development*. PLoS One; 9, 2639, 2008.
80. Kaminker PG, Kim SH, Taylor RD, Zebarjadian Y, Funk WD, Morin GB, Yaswen P, Campisi J. *TANK2, a new TRF1-associated PARP, causes rapid induction of cell death upon overexpression*. J. Biol. Chem; 276, 35891-35899, 2000.
81. De Rycker M, Venkatesan RN, Wei C, Price CM. *Vertebrate tankyrase domain structure and sterile alpha motif (SAM)-mediated multimerization*, Biochem. J; 372, 87-96, 2003.
82. Seimiya H, Smith S. *The telomeric poly(ADP-ribose) polymerase, tankyrase 1, contains multiple binding sites for telomeric repeat binding factor 1 (TRF1) and a novel acceptor, 182-kDa tankyrase-binding protein (TAB182)*, J. Biol. Chem; 277, 14116-14126, 2002.
83. Sbdio JJ, Lodish HF, Chi NW. *Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase)*, Biochem. J; 361, 451-459, 2002.
84. De Rycker M, Price CM. *Tankyrase polymerization is controlled by its sterile alpha motif and poly(ADP-ribose) polymerase domains*, Mol. Cell. Biol; 24, 9802-9812, 2004.
85. Seimiya H, Smith S. *The telomeric poly(ADP-ribose) polymerase, tankyrase 1, contains multiple binding sites for telomeric repeat binding factor 1 (TRF1) and a novel acceptor, 182-kDa tankyrase-binding protein (TAB182)*, J. Biol. Chem; 277, 14116-14126, 2002.
86. Cook BD, Dynek JN, Chang W, Shostak G, Smith S. *Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres*, Mol. Cell. Biol; 22, 332-342, 2002.
87. Smith S, de Lange T. *Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes*, J. Cell Sci; 112, 3649-3656, 1999.
88. Smith S, de Lange T. *Tankyrase promotes telomere elongation in human cells*, Curr. Biol; 10, 1299-1302, 2000.
89. Chang W, Dynek JN, Smith S. *TRF1 is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after release from telomeres*, Genes Dev; 17, 1328-1333, 2003.

-
90. Losada A, Hirano T. *Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins*, Genes Dev; 19, 1269-1287, 2005.
91. Nasmyth K, Haering CH. *The structure and function of SMC and kleisin complexes*, Annu. Rev. Biochem; 74, 595-648, 2005.
92. Dynek JN, Smith S. *Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis*, Science; 304, 97-100, 2004.
93. Sbodio JI, Chi NW. *Identification of a tankyrase-binding motif shared by IRAP, TAB182, and human TRF1 but not mouse TRF1. NuMA contains this RXXPDG motif and is a novel tankyrase partner*, J. Biol. Chem; 277, 31887-31892, 2002
94. Lydersen BK, Pettijohn DE. *Human-specific nuclear protein that associates with the polar region of the mitotic apparatus: distribution in a human/hamster hybrid cell*, Cell; 22, 489-499, 1980.
95. Chang W, Dynek JN, Smith S. *NuMA is a major acceptor of poly(ADP-ribose)ylation by tankyrase 1 in mitosis*, Biochem. J; 391, 177-184, 2005.
96. Chang P, Coughlin M, Mitchison TJ. *Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function*, Nat. Cell Biol; 7, 1133-1139, 2005.
97. Chi NW, Lodish HF. *Tankyrase is a Golgi-associated MAP kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles*, J. Biol. Chem; 275, 38437-38444, 2000.
98. Ishiki M, Klip A. *Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners*, Endocrinology; 146, 5071-5078, 2005.
99. Huang S, Mishina Y, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wielle E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F. *Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling*, Nature; 461, 614-620, 2009.
100. Dregalla RD, Zhou J, Idate RR, Battaglia C, Liber H, Bailey S. *Regulatory roles of tankyrase 1 at telomeres and in DNA repair: suppression of T-SCE and stabilization of DNA-PKcs* AGING; 2, 691-708, 2010.
101. Kim Y, Kim KO, Lee J, Lee JA, Kim M, Lee SJ, Park K, Yang H, Jin J, Min Joo K, Lee J and Nam DH. *Wnt activation is implicated in glioblastoma Radioresistance*. Laboratory Investigation; 1-8, 2011.

-
- 102.** Fancy SPJ, Harrington EP, Yuen TJ, Silbereis JC, Zhao C, Baranzini SE, Bruce CC, Otero JJ, Huang EJ, Nusse R, Franklin RJM, Rowitch DH. *Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination*. *Nature America*; 14:1009–1016, 2011.
- 103.** Yamada M, Shimizu K, Tamura K, Okamoto Y, Matsui Y, Moriuchi S, Park K, Mabuchi E, Yamamoto K, Hayakawa T. *Establishment and biological characterization of human medulloblastoma cell lines*. *Brain Nerve*; 41, 695-702, 1989
- 104.** Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM. *Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice*. *J Neuropathol Exp Neurol*; 44, 472–485, 1985
- 105.** Obe G, Johannes C, Schulte-Frohlinde D. *DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation*. *Mutagenesis*; 7, 3–12, 1992.
- 106.** Wojewódzka M, Buraczewska I, Kruszewski M. *A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody*. *Mutation Research*; 518, 9–20, 2002.
- 107.** Ratnam K, Low JA. *Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology*. *Clin Cancer Res*;13, 1383–1388; 2007.
- 108.** Annunziata CM and O'Shaughnessy J. *Poly (ADP-Ribose) Polymerase as a Novel Therapeutic Target in cancer*. *Clin Cancer Res*, 16, 4517–4526, 2010
- 109.** Cimmino F, Scoppettuolo M, Carotenuto M, De Antonellis P, Di Dato V, De Vita G, Zollo M *Norcantharidin impairs medulloblastoma growth by inhibition of Wnt/ β -catenin signaling*. *J Neurooncol*; 106, 59–70, 2011
- 110.** Baryawno N, Sveinbjörnsson B, Eksborg S, Chen CS, Kogner P, and Jones JI. *Small molecule inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Inhibit Wnt/ β -Catenin Pathway Cross-Talk and Suppress Medulloblastoma Growth*. *Cancer Res*; 70; 2138-2149, 2010.
- 111.** Luttjeboer M, Lafleur MV, Kwidama ZJ, Van Rijn J, Van Den Berg J, Slotman BJ, Kaspers GJ, Cloos J. *Strategies for the analysis of in vitro radiation sensitivity and prediction of interaction with potential radiation modifying agents*. *Int J Radiat Biol*; 86, 458–466, 2010.
- 112.** Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. *Clonogenic assay of cells in vitro*. *Nat Protoc*; 1, 2315–2319, 2006.

-
113. Afanasieva K, Zazhytska M, Sivolob A. *Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments*. *Electrophoresis*; 31, 512–519, 2010.
114. Wojewódzka M, Gràdzka I, Buraczewska I. *Modified neutral comet assay for human lymphocytes*. *Nukleonika*; 47, 1–5, 2002.
115. Olive PL, Banath JP. *Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd*. *Int J Radiat Biol*; 64, 349–358, 1993
116. Olive PL, Banath JP *Radiation-induced DNA doublestrand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay*. *Radiat Res*; 142, 144–152, 1995
117. Olive PL, Wlodek D, Banath JP *DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis*. *Cancer Res*; 51, 4671–4676, 1991
118. Rydberg B. *Radiation-induced heat-labile sites that convert into DNA double-strand breaks*. *Radiat Res*; 153, 805–812, 2000.
119. Wada S, Kurahayashi H, Kobayashi Y, Funayama T, Yamamoto K, Natsuhori M and Iot N, *The Relationship between Cellular Radiosensitivity and Radiation-Induced DNA Damage Measured by Comet Assay*. *J. Vet. Med. Sci*; 65, 471–477, 2003
120. Dunne AL, Price ME, Mothersill C, McKeown SR, Robson T and Hirst DG, *Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiationinduced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells*. *British Journal of Cancer*; 89, 2277–2283; 2003
121. Banath JP, Fushiki M, Olive PL. *Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation*. *Int J Radiat Biol*; 73, 649–660, 1998.
122. Zaffaroni N, Orlandi L, Villa R, Bearzatto A, Rofstad EK, Silvestrini R. *DNA double-strand break repair and radiation response in human tumour primary cultures*. *Int J Radiat Biol*; 66, 279–285, 1994
123. Eastham AM, Marples B, Kiltie AE, Orton CJ and West CML. *Fibroblast radiosensitivity measured using the comet DNA-damage assay correlates with clonogenic survival parameters* *Br J Cancer*; 79, 1366–1371, 1999.

