

INDICE

	Pag.
INTRODUZIONE.....	4
1. Il medulloblastoma.....	4
1.1 Generalità.....	4
1.2 Trattamento terapeutico.....	5
1.3 Classificazione, istogenesi e varianti istopatologiche.....	6
1.4 Marker prognostici e stratificazione del rischio	8
1.5 Sistemi molecolari implicati nella patogenesi.....	13
2. Il sistema WNT e β-catenina.....	17
2.1 Generalità	17
2.2 Il pathway WNT canonico.....	18
2.3 Le alterazioni del sistema WNT nel MB.....	20
2.4 Il crosstalk tra sistema WNT e p53.....	21
2.5 Il ruolo di β -catenina nella regolazione della morte e proliferazione cellulare.....	23
3. La risposta cellulare alle Radiazioni Ionizzanti (RI).....	27
3.1 Generalità.....	27
3.2 La risposta biologica alle RI.....	30
3.3 La scelta tra apoptosi e blocco del ciclo cellulare.....	35
3.4 Suscettibilità dei tumori alle RI.....	37
3.5 Ruolo di β -catenina nella risposta alle RI.....	40
SCOPO DELLA TESI.....	41

MATERIALI E METODI.....	43
1. Le linee cellulari.....	43
2. Il trattamento con radiazioni ionizzanti (RI).....	44
3. Il trattamento con cloruro di litio (LiCl).....	45
4. La vitalità cellulare.....	45
5. La curva di crescita.....	46
6. La citofluorimetria.....	46
6.1 Valutazione del ciclo cellulare.....	47
6.2 Valutazione dell'apoptosi.....	47
7 Il Western Blot (WB).....	48
7.1 Preparazione degli estratti proteici totali.....	48
7.2 Preparazione degli estratti proteici nucleari.....	49
7.3 Corsa elettroforetica, blotting e rivelazione degli estratti proteici.....	50
8 L'immunofluorescenza (IF).....	52
9 L'analisi statistica.....	53
RISULTATI.....	54
1. Effetti delle RI sulla crescita cellulare.....	54
2. Effetti delle RI sulla distribuzione delle popolazioni nel ciclo cellulare.....	54
3. Effetti delle RI sulla vitalità cellulare.....	55
4. Induzione di apoptosi da parte delle RI.....	55
5. Modulazione dei livelli intracellulari di β-catenina e p53 da parte delle RI.....	55
6. Effetti delle RI sulla localizzazione di β-catenina.....	56
7. Modulazione dei livelli intracellulari di β-catenina da parte del LiCl.....	57
8. Effetti del LiCl sulla localizzazione di β-catenina.....	57
9. Effetti del LiCl sulla crescita cellulare.....	57
10. Effetti del LiCl sul ciclo cellulare.....	57

11. Effetti del LiCl sulla vitalità cellulare.....	58
12. Effetti del LiCl sull'apoptosi.....	58
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	65
ICONOGRAFIA.....	79

INTRODUZIONE

1. Il medulloblastoma

1.1 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 ha origine istogenetica incerta. Più comune nei maschi che nelle femmine, l'incidenza si aggira intorno ai 5 bambini su milione di età 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]

Nella maggior parte dei casi il tumore è sporadico, ma nel 10% dei pazienti si osserva una predisposizione genetica ereditaria, come sindrome Turcot di tipo 2, nella sindrome di Gorlin, e nella sindrome Li-Fraumeni. ^[4-7] La sindrome di Turcot di tipo 2 è causata da mutazioni nella linea germinale del gene *apc* (*adenomatous polyposis coli*), coinvolto nel sistema molecolare di trasduzione del segnale WNT (Wingless Type), ed è caratterizzata dalla presenza concomitante di tumori cerebrali primitivi, tra cui il MB, e di FAP (Poliposi Adenomatosa Familiare). ^[8] La sindrome di Gorlin risulta da mutazioni ereditarie nel recettore Patched (Ptch), appartenente al sistema di signaling Sonic Hedgehog (Shh); viene anche definita sindrome dei nevi multipli basocellulari e consiste in carcinomi multipli a cellule basali (epiteliomi), cisti mandibolari multiple, anomalie vertebrali e della colonna (solitamente spina bifida) e calcificazioni della falx cerebri. ^[4] La sindrome di Li-Fraumeni è causata da mutazioni ereditarie nel gene oncosoppressore p53 e gli

individui affetti sviluppano neoplasie multiple, incluso il MB, sia a livello del SNC sia in altre sedi. ^[4]

Il medulloblastoma ha una notevole tendenza a metastatizzare nel SNC, attraverso il liquido cefalorachidiano, ma anche all'esterno del SNC, come nelle ossa, nel midollo osseo, in linfonodi, nel fegato e nei polmoni. Al momento della diagnosi, circa un terzo dei pazienti presentano disseminazione metastatica nel SNC e un piccolo, ma significativo, numero di pazienti presenta metastasi extraneurali. ^[7]

1.2 Trattamento terapeutico

La terapia classica associa l'asportazione del tumore primitivo alla radioterapia dell'intero neuroasse. La chemioterapia adiuvante si è dimostrata utile in tutti gli stadi della malattia. ^[7] Esistono differenze sostanziali tra i protocolli terapeutici applicati in USA e quelli applicati in Europa: i primi hanno applicato una consistente riduzione della dose di radiazioni (da 36.0 Gy a 23.4 Gy), compensando tale riduzione con nuovi trattamenti chemioterapici adiuvanti; i secondi hanno mantenuto il trattamento post-operatorio dei pazienti a rischio standard con alte dosi di radiazioni (36.0 Gy), combinate sempre a chemioterapia adiuvante. ^[7] Con gli attuali protocolli, la sopravvivenza a cinque anni senza recidiva varia dal 25% al 70%, in rapporto alla qualità dell'exeresi, alla presenza di metastasi diffuse al momento della diagnosi e all'età del paziente, fattori che distinguono i pazienti ad alto rischio da quelli a rischio standard. ^[3,7]

La malattia e il suo trattamento comportano effetti collaterali a lungo termine, soprattutto neuroendocrini e cognitivi, in particolare per i bambini con età inferiore agli 8 anni. Per i bambini con età inferiore ai tre anni si stanno sviluppando nuovi protocolli terapeutici per minimizzare la tossicità associata al trattamento, senza comprometterne l'efficacia. Il SNC è infatti ancora in sviluppo e la radioterapia cranio-spinale causa danni molto gravi al tessuto sano

circostante il tumore. Una proposta terapeutica vede affiancate alle radiazioni e alla chemioterapia il recupero di cellule staminali autologhe del paziente trattato. Questo trattamento è ben tollerato e la sopravvivenza a breve termine porta risultati promettenti: è, però, ancora da dimostrare l'efficacia a lungo termine. [7]

L'approccio terapeutico futuro potrebbe essere quello di utilizzare diverse combinazioni tra inibitori e induttori dei diversi pathway coinvolti nella patogenesi in associazione a terapie convenzionali. [6,7]

1.3 Classificazione, istogenesi e varianti istopatologiche

La WHO (World Health Organization, Organizzazione Mondiale della Sanità) annovera il MB fra i tumori embrionali del SNC. Tuttavia una classificazione più precisa al momento è difficile, a causa dell'origine istogenetica incerta del tumore. E' stato ipotizzato che alcuni MB derivino dallo strato dei granuli esterni e altri da cellule progenitrici comuni come le cellule della matrice subependimale. A lungo si è dibattuto se considerare il MB fra i tumori neuroectodermici primitivi (PNET, Primitive Neuroectodermal Tumors) proprio perché almeno un sottogruppo di MB, la variante desmoplastica, origina dalle cellule dallo strato dei granuli esterni (EGL, External Granular cell Layer) del cervelletto e quindi ha istogenesi assimilabile a quella dei PNET. Tuttavia il MB si differenzia dai PNET per altri aspetti: alcune alterazioni genetiche coinvolte nella sua evoluzione, diversi aspetti molecolari nonché per la risposta alla radio- e alla chemioterapia. Per tali motivi l'orientamento attuale della WHO è quello di classificare il MB separatamente dai PNET. [2,9]

La classificazione della WHO comprende diverse varianti istopatologiche del MB:

- **MB classico** (~70% dei casi), caratterizzato da cellule densamente stipate di forma rotondo-ovalare con nucleo ipercromatico e scarso citoplasma. In meno del 40% dei casi sono presenti delle rosette

neuroblastiche. Dal punto di vista ultrastrutturale, le rosette neuroblastiche sono caratterizzate dalla presenza di cellule differenziate in senso neuronale/neurocitico con prolungamenti citoplasmatici di tipo neuritico, localmente adesi gli uni agli altri per la presenza di placche specializzate di adesione intercellulare, giunzioni di tipo aderente;

- **MB desmoplastico** (~15%), caratterizzato da aspetto nodulare della lesione in cui cellule indifferenziate producenti collagene circondano nidi di cellule maggiormente differenziate in senso neurocitico;
- **MB ad estesa nodularità** (meno dell'1%) con cellule intranodali che mostrano una marcata differenziazione neuronale associata alla presenza di un feltro fibrillare;
- **MB a grandi cellule/anaplastico** (~10%), composto da cellule grandi con nuclei rotondi, oppure pleiomorfi e angolati, e nucleoli prominenti. Sono spesso presenti abbondanti mitosi, numerose cellule apoptotiche ed estese aree di necrosi;
- **MB melanotico** e **medullomioblastoma**, due varianti estremamente rare del MB classico. Il MB melanocitico si differenzia dal MB classico solo per la presenza di melanina nelle cellule, che si possono organizzare in cluster e assumere un aspetto epitelioido e un'architettura tubulare o papillare; il medullomioblastoma mostra aspetti di differenziamento rabdomioblastico, per cui la formazione di fibrille muscolari può risultare evidente, oppure le cellule sparse, grandi e globulari possono presentare reattività alla desmina o caratteristiche rabdomioblastiche a livello ultrastrutturale. [2]

L'insieme di queste varianti si può considerare uno spettro continuo, con un gradiente di differenziazione crescente, andando dal MB a grandi cellule ad un estremo, al MB ad estesa nodularità all'altro estremo. [2,3,7,10] È stato di recente riportato che la classificazione clinicopatologica del MB correla con l'espressione dei fattori di trascrizione OTX1 e OTX2. Praticamente tutti i MB esprimono OTX1,

OTX2 o entrambi; l'mRNA di OTX2 correla con l'istotipo classico mentre l'espressione del solo mRNA di OTX1 correla con la variante desmoplastica. [6]

1.4 Marker prognostici e stratificazione del rischio

Diversi trials clinici hanno portato all'identificazione di tre importanti fattori prognostici:

- **Età del paziente al momento della diagnosi:** per i bambini con 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 rispetto alla presenza di residui di minore estensione o alla rimozione totale della massa tumorale;
- **Metastasi tumorali:** la presenza, al momento della diagnosi, di metastasi nel SNC o extraneurali, rappresenta un fattore prognostico negativo. [7]

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 e della stadiazione secondo i criteri di Chang ovvero in base alla dimensione/localizzazione del tumore (stadio T) e alla presenza di metastasi (stadio M). [7,11]

Sebbene la classificazione del rischio sia attualmente fatta sulla base di questi parametri clinici è ormai riconosciuto come caratteristiche istopatologiche e molecolari/genetiche possano costituire strumenti

estremamente utili per predire il comportamento biologico del MB e la sua capacità di rispondere alle terapie.

La prognosi del MB dipende dal quadro istopatologico: i MB ad estesa nodularità hanno, in genere, un decorso clinico positivo: tanto più il grado di nodularità è esteso e più è spiccata la differenziazione in senso neuronale delle cellule intranodulari più la prognosi migliora. I MB a grandi cellule/anaplastiche sono 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.

[10,12,13] Giangaspero F e collaboratori hanno recentemente analizzato 364 casi di MB, tra cui i 257 che mostrano caratteristiche anaplastiche sono stati suddivisi in tre gruppi: MB con anaplasia lieve, moderata e severa. Questi autori concludono che il grado di anaplasia correla fortemente con la prognosi ovvero che i casi con anaplasia severa hanno sopravvivenza libera da malattia a 5 anni significativamente più bassa rispetto a quelli con anaplasia lieve o moderata. [13] E' opportuno sottolineare che la valutazione istologica di anaplasia è molto difficile e soggettiva come dimostra il fatto che i dati dello studio di Giangaspero F e collaboratori, secondo i quali la maggior parte dei casi rientra nei gruppi ad anaplasia moderata (59%) e severa (34%), discordano con quelli riportati da Eberhart CG e collaboratori per i quali invece la maggior parte dei casi (70%) non mostra o mostra solo lievemente segni di anaplasia. [1] D'altra parte, se i casi del primo studio vengono suddivisi in due grandi gruppi, MB senza anaplasia (MB con anaplasia lieve e MB con anaplasia moderata) e MB con anaplasia (MB con anaplasia severa), questi risultano numericamente simili a quelli di Eberhart CG e in entrambi gli studi questi due gruppi sono associati a prognosi significativamente diversa. Ciò significa che, al di là della soggettività, l'istologia da sola riesce a discriminare tra casi con prognosi sensibilmente diversa ed ha quindi utilità clinica nello stratificare i pazienti ad alto o basso rischio. [13]

Il significato dell'apoptosi nel MB non è ancora chiaro, non essendoci concordanza tra i dati presenti in letteratura; secondo alcuni autori l'apoptosi sarebbe un marker prognostico positivo ^[14], per altri è associata a prognosi negativa ^[15], secondo altri ancora non ha alcun valore prognostico. ^[16]

Sebbene non siano ancora entrati nella pratica clinica diversi marcatori genetici e molecolari sono stati identificati e proposti per perfezionare la stratificazione del rischio.

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 a comportamento biologico aggressivo del tumore. ^[17]

I dati presenti in letteratura riguardanti l'associazione tra questa aberrazione e una determinata variante istopatologica sono discordanti poiché alcuni lavori riportano che essa è sempre associata al tipo a grandi cellule/anaplastico ^[18] mentre altri autori l'hanno ritrovata in tutte le varianti anche se più frequentemente in quelle non desmoplastiche (dove sono invece frequenti la perdita di 9q22 e 10q24, loci cromosomici contenenti geni del pathway Shh). ^[17]

L'elevata frequenza della perdita del 17p nel MB suggerisce che a questo livello **siano** presenti uno o più geni oncosoppressori correlati alla neoplasia. Il gene p53, che si trova sul braccio corto del cromosoma 17, è mutato in una bassa percentuale (10%) dei casi il che non rispecchia l'elevata frequenza con cui invece si riscontra l'aberrazione cromosomica. ^[3,19,20] Il gene oncosoppressore HIC-1, codificante un fattore di trascrizione e localizzato in 17p13.3 è ipermetilato, quindi inattivato, nella maggior parte dei MB ma il significato biologico del suo coinvolgimento non è ancora stato chiarito. ^[20] Alterazioni del pathway oncosoppressore p53-ARF sono comunque implicate nella patogenesi del MB; la perdita di p53 accelera, ad es., lo sviluppo della neoplasia in modelli murini della malattia ^[21] e nell'uomo la delezione di p53 predispone all'insorgenza del MB come avviene nella sindrome di Li Fraumeni. ^[19] Elevati livelli di espressione di p53 (marker surrogato della presenza di una

proteina mutata e non funzionante) sono associati a prognosi negativa. [19,22] Nel complesso il pathway p53-ARF è coinvolto nel 20% circa dei casi considerando anche alterazioni di altre componenti del pathway, 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. [19,23] Alterazioni del pathway di p53 sono più frequenti nell'istotipo a grandi cellule/anaplastico 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. Considerato che p53 svolge un ruolo fondamentale nella modulazione della radio- e chemiosensibilità si spiega, almeno in parte, perché la variante a grandi cellule/anaplastica sia largamente resistente ai trattamenti. [19,24] Come è già stato accennato, l'amplificazione dell'oncogene c-myc e gli elevati livelli del suo trascritto sono associati a prognosi sfavorevole; l'amplificazione di c.myc è stata identificata nel 10-15% dei MB ed è correlata al sottotipo a grandi cellule/anaplastico anche se non si tratta di un'associazione assoluta. [25]. Anche l'iperespressione ErbB2 è un marker di aggressività del tumore mentre l'espressione del trascritto di TrkC (*NT3 high-affinity neurotrophin tyrosine kinase receptor*) [7,9,25] e la nucleopositività per β -catenina sono associate a prognosi favorevole. [26] TrkC, recettore della neurotrofina 3, promuove l'apoptosi nelle cellule di MB. Questo effetto non è fisiologico dell'attivazione di TrkC, che normalmente porta alla neurogenesi e alla maturazione delle cellule dei granuli di cervelletto. In cellule di MB, incapaci di differenziarsi, l'effetto antineoplastico è quello di promuovere l'apoptosi. [3]

Dai dati di uno studio recente [26] condotto su un'ampia e uniformemente trattata coorte di pazienti con MB classico o anaplastico emerge un'associazione significativa tra positività nucleare per β -catenina, indicativa di attivazione del sistema WNT, e prognosi favorevole sia in termini di sopravvivenza totale che di sopravvivenza

libera da malattia. Inoltre, bambini con nucleopositività per β -catenina che presentano metastasi alla diagnosi o MB a grandi cellule non hanno una prognosi così negativa come quella attesa. Si tratta di una scoperta inattesa visto il ruolo di β -catenina nel promuovere la proliferazione dei progenitori neuronali nonché la crescita cellulare e la progressione neoplastica in alcune neoplasie quali il tumore colon-rettale, l'epatocarcinoma o il carcinoma polmonare. Gli effetti dell'attivazione di WNT sono comunque molteplici e tessuto-specifici e spaziano da quelli sopra descritti a conseguenze opposte quali l'induzione di apoptosi e/o l'arresto della crescita cellulare. ^[26] E' importante inoltre ricordare che l'espressione di una forma mutata e non degradabile di β -catenina in neuroni differenziati di topi transgenici non comporta lo sviluppo di tumori o altre alterazioni morfologiche suggerendo che l'attivazione aberrante di WNT nei neuroni adulti ben differenziati non sia uno stimolo sufficiente alla formazione di tumori del SNC. ^[5] Secondo Ellison DW e collaboratori, l'attivazione del 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 estremamente radiosensibili. In alternativa potrebbe portare alla selezione di un fenotipo meno aggressivo. Dato che la presenza di β -catenina nel nucleo è valutabile su tessuti fissati in paraffina, la sua utilità come fattore prognostico è maggiore rispetto a quei fattori che possono essere esclusivamente valutati su tessuto fresco. ^[26]

In conclusione, la stratificazione del rischio come viene attualmente effettuata è imprecisa poiché non è in grado di identificare né quel 20-30% di pazienti a rischio medio ma con neoplasia resistente alle terapie né l'indeterminabile numero di soggetti a rischio medio che ricevono trattamenti eccedenti le loro reali necessità. ^[7] Come i risultati di alcuni studi hanno evidenziato ^[9,13,17,24-26] una stratificazione del rischio che utilizzi la combinazione di parametri clinici e marker istopatologici e molecolari/genetici ha invece la potenzialità di identificare i pazienti con tumori biologicamente più

aggressivi per i quali la terapia massimale o trattamenti sperimentali sono indicati e i pazienti con tumori meno aggressivi che possono essere curati con terapie leggermente più blande in modo da evitare, almeno in parte, gli effetti collaterali ad esse associati.

1.5 Sistemi molecolari implicati nella patogenesi

Sistemi molecolari differenti potrebbero essere alla base delle diverse varianti istopatologiche di MB.

L' *Insulin-Like Growth Factor* (IGF) e i recettori di superficie cellulare

Gli IGF I e II sono peptidi con elevata omologia di sequenza con l'insulina. Il cosiddetto asse IGF include due IGF, IGF-I e IGF-II, due recettori IGF-IR e IGF-IIR e sei IGF-binding proteins (da IGFBP-1 a IGFBP-6). Gli IGF promuovono la proliferazione cellulare e inibiscono la morte cellulare programmata. Si presume che IGF-II sia principalmente implicato nello sviluppo embrionale precoce mentre IGF-I giochi un ruolo principalmente nell'adulto esercitando il suo effetto sostanzialmente su tutte le cellule umane. Oltre ad avere effetti simili a quelli dell'insulina, IGF-I è un potente peptide neurotrofico in grado di stimolare la proliferazione e il differenziamento in particolare delle cellule nervose. E' stato dimostrato che l'aumento di espressione di IGF-I riduce la lunghezza della fase G1 del ciclo cellulare e favorisce il rientro in ciclo delle cellule progenitrici neuronali nel corso di una altrimenti normale neurogenesi corticale. Il messaggero di IGF-I e la proteina IGF-IR sono stati trovati sia in campioni di MB sia in linee cellulari derivate. La stimolazione di tali linee cellulari con IGF-I aumenta il tasso di proliferazione mediante l'attivazione del pathway di Erk-1/2. Non solo è stata riscontrata la presenza del recettore in un'elevata percentuale di campioni biotipici ma anche la sua attivazione. Non è emersa alcuna correlazione tra la presenza di

IGF-IR attivato e sottotipo di tumore, età, sesso del paziente o localizzazione del tumore il che porta a supporre che si tratti di un meccanismo generale coinvolto nella patogenesi del MB. L'unica correlazione positiva esiste con TrkC: tutti i campioni positivi per TrkC sono negativi per il recettore di IGF attivato e viceversa tutti i campioni positivi per la forma attiva di IGF-IR sono negativi per Trk-C. Come già accennato, la stimolazione di IGF-IR e IGF-IIR induce la proliferazione cellulare e impedisce la morte cellulare mediante attivazione di Akt/PKB e Erk-1/2. Entrambe le chinasi fosforilano una serie di substrati tra cui la tuberina, una proteina che forma un complesso intracellulare (il complesso TSC) con l'amartina il quale controlla mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) il principale regolatore della traduzione nelle cellule di mammifero. La fosforilazione di Akt/PKB e/o di Erk-1/2, ritrovata nelle biopsie di MB umano, ma non nel tessuto cerebellare normale, abolisce il controllo su mTOR e induce la traduzione di proteine che regolano il ciclo cellulare come la ciclina D1. E' stato inoltre recentemente ipotizzato che TSC faccia parte del pathway WNT, si associ al complesso di degradazione della β -catenina, e agisca regolando negativamente la trascrizione dei geni target di WNT; la fosforilazione di Akt/PKB e/o Erk-1/2 impedirebbe la formazione del complesso TSC e ciò si tradurrebbe in un aumento della trascrizione dei suddetti geni coinvolti nella regolazione del ciclo come c-myc, n-myc o ciclina D1.^[6]

Recettori tirosin chinasi della famiglia ErbB, a cui appartengono ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2/Neu), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4) sono spesso espressi nei tumori cerebrali primitivi, ma non nelle controparti normali. Diversamente da EGFR, ErbB3 e ErbB4, che non hanno significato prognostico nel MB, l'iperespressione di ErbB2 ha valore prognostico negativo. La dimerizzazione del recettore porta ad attivazione dei pathway Akt/PKB e Erk-1/2 con effetti sulla proliferazione, il differenziamento cellulare, l'attivazione di componenti delle cascate metastatiche e angiogeniche. Akt/PKB attivata fosforila inoltre p21^{CIP1/WAF1}, un inibitore della proliferazione,

determinando la traslocazione di tale fattore dal nucleo al citoplasma e l'aumento del tasso di proliferazione cellulare. [6,7]

Il recettore per le chemochine CXCR4 (*CXC motif receptor 4*) è una delle tante molecole essenziali per lo sviluppo della corteccia cerebellare come dimostra il fatto che la delezione del gene codificante comporta importanti anomalie dello sviluppo cerebellare. Una delle principali caratteristiche degli animali mancanti di CXCR4 è la perdita della capacità proliferativa da parte dei precursori dei granuli cerebellari. E' verosimile pertanto che CXCR4 sia un bersaglio di mutazioni associate al MB. *In vitro*, CXCR4 esercita effetti proliferativi, antiapoptotici e chemotattici su linee cellulari di MB. Mutazioni di *cxcr4* sono state tuttavia ritrovate in una piccola percentuale di casi di tumore ed è stato ipotizzato che l'up-regolazione del pathway mediato da CXCR4 sia il risultato dell'attivazione di un altro pathway coinvolto nella patogenesi del MB, il pathway Shh. I MB classici mostrano livelli di mRNA per CXCR4 molto bassi, mentre i livelli sono elevati in tutti i MB desmoplastici e nodulari. La capacità di CXCR4 di promuovere la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule dipende dalla stimolazione di Akt/PKB e Erk-1/2 come è stato dimostrato in linee cellulari di MB. [6]

Le proteine *Notch* sono dei recettori, altamente conservati nel corso dell'evoluzione, la cui segnalazione è essenziale per lo sviluppo, la proliferazione e la determinazione del destino cellulare di molte, se non tutte, le specie multicellulari. Sono stati identificati almeno quattro recettori *Notch* nei vertebrati. Il legame del ligando, *Jagged*, ai *Notch*, porta a clivaggio proteolitico del dominio intracellulare del recettore che trasloca al nucleo dove attiva uno specifico programma di trascrizione genica. La deregolazione del pathway molecolare ha effetto oncogenico anche se rimane da chiarire il ruolo preciso dei recettori *Notch* nella tumorigenesi. Il messaggero di *Notch2* è abbondantemente espresso nei MB e sembra essere associato a prognosi negativa. Il trattamento di topi con MB indotto da xenotrapianto della linea di MB umano D283MED con molecole che

prevengono il clivaggio del dominio intracellulare di *Notch* porta ad inibizione della proliferazione e ad aumento di apoptosi confermando che la segnalazione Notch contribuisce alla crescita e alla sopravvivenza del MB umano. [6,27]

Il Pathway *Sonic Hedgehog* (Shh)

Shh è una glicoproteina abbondantemente espressa durante lo sviluppo cerebellare da parte delle cellule del Purkinje ed è uno dei principali mitogeni delle cellule progenitrici dei granuli cerebellari esterni. Una volta secreta, Shh lega *Patched* (Ptch), un recettore a dodici domini transmembrana, espresso principalmente nei precursori dell'EGL. Ptch inibisce un altro recettore a sette passaggi trans-membrana, *Smoothened* (Smoh), strettamente correlato alla famiglia dei recettori *Frizzled* del pathway WNT, dotato di intrinseca attività catalitica e di segnalazione. In assenza dell'attività di Smoh i fattori Gli, effettori del pathway Shh, sono trattenuti a livello dei microtubuli da un complesso multiproteico che include le proteine *Fused* e *Suppressor of Fused* (Sufu). Sequestrata in tal modo, Gli1 non può svolgere la sua funzione di attivatore della trascrizione, mentre altri due membri della famiglia, Gli2 e Gli3, vengono attivati per taglio proteolitico assumendo il ruolo di repressori trascrizionali. Il legame di Shh a *Patched* attiva Smoh, il complesso contenente *Fused* e Sufu viene disassemblato, Gli1 viene rilasciato mentre il taglio di Gli2 e Gli3 è bloccato. Tra i geni target di Gli1 ricordiamo: gli-1 stesso, i geni codificanti i fattori WNT, ptch, n-myc, c-myc e ciclinaD1. Mutazioni di ptch e di sufu sono state identificate in circa il 20% dei MB umani i quali presentano preferenzialmente, ma non esclusivamente, morfologia desmoplastica. [7,27] La perdita del braccio corto del cromosoma 17 è stata recentemente identificata come causa di deregolazione del sistema molecolare Shh; tale delezione comporta la perdita di REN^{KCTD11} (con frequente mutilazione dell'altro allele): REN è altamente espresso nel comparto non proliferante (il più interno) dell'EGL e nell'IGL ma non in quello altamente proliferante e più esterno dell'EGL. Esperimenti *in*

vitro dimostrano che l'up-regolazione di REN porta a differenziamento e arresto della crescita dei precursori dei granuli cerebellari antagonizzando gli effetti dell'attivazione del pathway Shh; REN sembrerebbe quindi reprimere la segnalazione Shh quando i precursori migrano dallo strato più esterno a quello più interno dell'EGL. La perdita di REN implica la rimozione di tale limite all'espansione di cellule immature, favorendo lo sviluppo del MB. ^[6]

2. Il sistema WNT e β -catenina

2.1 Generalità

Il sistema molecolare WNT (*Wingless Type*) regola il differenziamento, la polarità, la migrazione e il destino cellulare. Controlla pertanto lo sviluppo embrionale di molti organi e tessuti tra cui il SNC in diversi organismi animali (ad es. in *Drosophila Melanogaster*, *Xenopus Laevis*, *Caenorhabditis Elegans*, *Mus Musculus*, *Homo Sapiens*). ^[28] Studi sul topo hanno dimostrato come le proteine WNT fungano da mitogeni per le cellule del sistema nervoso e da fattori di segnalazione essenziali nella formazione degli arti, dei reni e dell'apparato riproduttivo femminile. Nell'adulto, questo sistema provvede al mantenimento dell'omeostasi tissutale nell'epitelio intestinale, nella pelle e nel tessuto emopoietico. ^[29] Mutazioni a carico del sistema WNT compromettono seriamente lo sviluppo embrionale e sono implicate nella patogenesi di diversi tipi di cancro. ^[30] Nell'uomo sono stati identificati 19 geni wnt, la cui struttura è molto simile: infatti la maggior parte di essi comprende 4 esoni codificanti di cui il primo contiene la metionina iniziale. La loro localizzazione cromosomica è nota e molti sono organizzati in cluster di due geni posizionati vicini lungo il cromosoma. ^[31] Si ritiene che essi si siano generati durante l'evoluzione per duplicazione di uno o

pochi geni ancestrali e/o per eventi di traslocazione genica. Le proteine WNT condividono un'omologia di sequenza che va dal 27% all'83% e sono altamente conservate tra specie diverse, dalla *Drosophila*, al topo, all'uomo (mentre sono assenti nelle piante, negli eucarioti unicellulari e nei procarioti).^[28] Tali proteine hanno una dimensione che va dai 39 ai 46 KDa e, una volta secrete, si associano strettamente con i glicosaminoglicani della matrice extracellulare e si legano alla superficie cellulare, mediante specifici recettori^[32]; non è chiaro se agiscano come monomeri, oligomeri o complessi multiproteici.^[33] La regione carbossi-terminale delle proteine WNT è responsabile della specificità di risposta; mentre la porzione amino-terminale è deputata all'interazione con recettori di membrana, ma necessita della porzione carbossi-terminale per la loro attivazione.^[28]

2.2 Il pathway WNT canonico

Le proteine WNT agiscono legandosi ai recettori *Frizzled* (Fzd)^[34,35], i quali presentano un dominio extracellulare N-terminale ricco di cisteine che lega la proteina WNT, sette eliche transmembrana e una corta coda citoplasmatica carbossiterminale. Per l'attivazione del sistema è necessaria anche la presenza dei corecettori LRP (*LDL-related protein*) e la formazione del complesso ternario (WNT/Fzd/LRP).^[28]

I segnali WNT sono trasdotti attraverso almeno tre vie distinte di segnalazione intracellulare, che comprendono il pathway canonico "WNT/ β -catenina", il pathway "WNT/ Ca^{2+} ", il pathway "WNT/polarità".^[29] Il più studiato è il pathway "WNT/ β -catenina", la cui funzione principale è quella di regolare i livelli intracellulari di β -catenina. Questa proteina esiste in tre pool a localizzazione e funzione diverse (figura 1):^[36]

- β -catenina legata all'E-caderina a livello della membrana plasmatica;

- β -catenina nucleare complessata a fattori di trascrizione della famiglia TCF (*T-Cell Factor*) / LEF (*Lymphoid Enhancing Factor*) che promuove la trascrizione dei geni bersaglio;
- β -catenina legata al complesso APC/Axina/GSK-3 β , che la indirizza alla degradazione.

β -catenina è coinvolta nelle giunzioni aderenti delle cellule epiteliali: la sua funzione è fare da ponte tra il citoscheletro e le molecole di E-caderina, che mediano l'adesione omotipica tra le cellule. Il dominio citoplasmatico dell'E-caderina lega la β -catenina o la γ -catenina (anche detta pacoglobina) e queste a loro volta legano l' α -catenina, associata ai filamenti di actina citoscheletrica direttamente o tramite proteine actina-associate, quali l' α -actinina e la vinculina^[37,38].

In assenza di segnalazione WNT, β -catenina è degradata rapidamente dal complesso multiproteico APC/Axina/GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β). In tale complesso APC e Axina facilitano la fosforilazione di β -catenina da parte di GSK-3 β e ne sono esse stesse substrato, venendo fosforilate e aumentando così la quantità di β -catenina legata. Una volta fosforilata β -catenina viene legata dalla proteina F-box β -TrCP (*β -transducin repeat containing protein*), una componente del complesso E3 ubiquitina ligasi, che la rende poliubiquitinata e quindi degradabile dal proteasoma (figura 1).^[36]

In presenza delle proteine WNT, i recettori Fzd e LRP vengono attivati e causano due eventi distinti. Innanzitutto l'axina si lega al dominio citoplasmatico di LRP, fosforilato in Ser/Thr dalla caseina chinasi I γ (CKI γ) e da GSK-3 β , e viene sequestrata a livello della membrana plasmatica, dove viene inattivata e/o indirizzata alla degradazione.^[29]

Viene inoltre indotta la fosforilazione di *Dishevelled* (Dvl), proteina dello scaffold citoplasmatico, probabilmente attraverso attivazione della caseina chinasi I ϵ (CKI ϵ) e/o dalla caseina chinasi II (CKII); Dvl fosforilata interagisce anch'essa con l'axina e inattiva GSK-3 β . Ciò determina un aumento di β -catenina citoplasmatica non fosforilata, la quale migra nel nucleo dove funge da trans-attivatore trascrizionale dei suoi geni target, complessandosi ai fattori di trascrizione TCF/LEF

(figura 1). Alcuni sono geni importanti per la progressione del ciclo cellulare, come ad esempio c-myc, ciclina D1 e gastrina, altri sono invece inibitori dell'apoptosi, come survivina, oppure geni promuoventi la progressione tumorale, come laminina- γ 2, e mmp7 (*matrix metalloproteinase-7*), che codificano per proteine coinvolte nella degradazione della membrana basale e della matrice extracellulare. [28,39] Quando il sistema WNT non è stimolato, i fattori di trascrizione TCF/LEF rimangono associati con i corepressori trascrizionali Gro (*Groucho*) e CtBP (*C-Terminal Binding Protein*) che interagiscono con le istone-deacetilasi (HDAC), formando un complesso inattivo. [39,40]

2.3 Le alterazioni del sistema WNT nel MB

Mutazioni di alcune delle componenti intracellulari del pathway WNT/ β -catenina sono implicate nella patogenesi di molte neoplasie umane. Queste mutazioni portano all'attivazione incontrollata del sistema WNT e alla conseguente induzione dell'espressione dei geni bersaglio, già descritti. [30] E' stato visto, inoltre, che, in seguito all'attivazione di WNT, durante lo sviluppo dei carcinomi, le cellule subiscono una transizione epitelio-mesenchimale, in cui i complessi E-caderina/ β -catenina/ α -actina si dissociano e vengono perse le giunzioni aderenti; questo aspetto è correlato ad una prognosi peggiore. [41]

Negli individui affetti da sindrome di Turcot di tipo 2 il rischio di sviluppare il MB è 92 volte superiore rispetto alla popolazione generale. Questo suggerisce che alterazioni del sistema WNT possano essere coinvolte anche nello sviluppo del MB sporadico. [8] Mutazioni di componenti del pathway "WNT/ β -catenina" sono state riscontrate, infatti, in circa il 15% dei MB sporadici. [42] La maggior parte di queste mutazioni avviene a carico del gene *ctnnb1*, codificante la β -catenina, e riguarda i residui di serina S33 e S37 della proteina, sede di fosforilazione da parte di GSK-3 β ; tali mutazioni hanno l'effetto di

impedire la fosforilazione e di conseguenza la degradazione di β -catenina. Mutazioni di β -catenina sono state descritte sia in casi di MB classico che desmoplastico indicando che l'alterazione del segnale WNT potrebbe essere coinvolta in entrambi i sottotipi. ^[43] Altre mutazioni, sebbene meno comuni, sono state descritte nei geni *apc* e *axin1*: l'effetto di queste mutazioni è sempre quello di impedire la fosforilazione di β -catenina da parte di GSK-3 β e quindi di promuoverne l'accumulo nucleare. ^[7]

2.4 Il crosstalk tra sistema WNT e p53

La proteina p53 ricopre un ruolo fondamentale nella regolazione della progressione del ciclo e del destino cellulare in seguito a stress e a danno genotossico. In assenza di stress, danni al DNA o deregolazione dei sistemi correlati, i livelli di p53 sono mantenuti bassi; aumentano repentinamente a seguito di un insulto di varia natura: danni diretti al DNA, aberrazioni cromosomiche, attivazione di oncogeni, ipossia, accorciamento dei telomeri. ^[44]

P53 è innanzitutto un attivatore trascrizionale sequenza-specifico e le proteine codificate dai suoi geni target attivano diversi sistemi molecolari implicati in fenomeni quali apoptosi, arresto della crescita cellulare, senescenza, differenziazione e riparazione del DNA. Mutazioni a carico di questo oncosoppressore critico, o di geni dei pathway molecolari in cui è coinvolto, sono infatti implicati in più del 50% dei tumori umani. ^[44]

L'attività di p53 è regolata dalla molecola MDM2, oncogene iperespresso in un numero significativo di tumori umani. MDM2 lega p53 inattivandola e questo avviene attraverso due meccanismi distinti: da una parte MDM2 occupa il dominio N-terminale di p53 deputato alla transattivazione, competendo così con l'attività trascrizionale; dall'altra indirizza p53 alla degradazione da parte del proteasoma, agendo da ubiquitina ligasi E3 p53-specifica. A sua volta p53 regola,

con un meccanismo a feedback negativo, la trascrizione del gene MDM2, il quale possiede due siti di legame per p53 nella regione del promotore. Quando p53 è attiva porta all'arresto del ciclo cellulare o all'induzione dell'apoptosi; la scelta di quale via intraprendere dipende dal contesto cellulare, definito dal bilancio di eventi di segnalazione intracellulare ed extracellulare. ^[44]

Oltre alla funzione di attivatore trascrizionale, p53 può anche reprimere la trascrizione di un ampio gruppo di promotori ^[45]: può selettivamente reprimere uno o più geni anti-apoptotici, con risultati essenzialmente simili all'attivazione dei geni pro-apoptotici. Bcl-2 è una proteina anti-apoptotica, la cui espressione è bloccata da p53 ^[46,47]; viene attivata invece la trascrizione di geni pro-apoptotici, come Bax. Vi sono anche funzioni pro-apoptotiche di p53 indipendenti dalla sua attività di fattore di trascrizione: essa infatti promuove la traslocazione di Fas/CD95/Apo-1 dal citoplasma alla membrana plasmatica e di Bax dal citoplasma alla membrana mitocondriale. P53 stessa può trovarsi associata al mitocondrio in condizioni promuoventi l'apoptosi suggerendo un coinvolgimento diretto della proteina nella via di segnalazione mitocondriale. ^[44,48]

Particolarmente interessante è studiare come p53 interagisca con altre proteine coinvolte nell'omeostasi tissutale e nella regolazione del delicato equilibrio tra proliferazione e morte cellulare. Di nostro interesse, in particolare, è il crosstalk con β -catenina che quando è deregolata causa attivazione di p53. ^[49] Molto probabilmente si tratta di un meccanismo di difesa messo in atto dalla cellula di fronte all'imminente minaccia tumorigenica, rappresentata dall'attivazione dell'oncogene *ctnnb1*. L'abilità di p53 di "orchestrare" la risposta a questo tipo di minaccia, inducendo l'apoptosi o bloccando la proliferazione cellulare, è indice della sua importanza come oncosoppressore. L'induzione di p53 da parte di β -catenina deregolata è strettamente dipendente dalla proteina ARF, prodotto di un altro importante oncosoppressore. ^[50] L'aumento di β -catenina comporta aumento dei livelli dell'mRNA di ARF e quest'ultima lega MDM2,

bloccandone la funzione e contrastando così l'inibizione di p53. ^[44]
D'altra parte in assenza di p53 funzionale, condizione assai frequente nei tumori, β -catenina è libera di esercitare i suoi effetti oncogenici e di guidare la cellula verso la trasformazione neoplastica (figura 2) ^[50]
E' emerso che, non solo p53 è modulata dai livelli di β -catenina, ma che si può avere anche la situazione inversa. L'attivazione di p53 può infatti portare alla degradazione proteolitica di β -catenina, favorendone l'ubiquitinazione, attraverso diverse vie: una mediata dal complesso APC/Axina/GSK-3 β di cui abbiamo già parlato; un'altra mediata dal complesso PKA/Presenilina/GSK-3 β ; infine una mediata da Siah-1 che non coinvolge GSK-3 β . ^[51-53]

2.5 Il ruolo di β -catenina nella regolazione della morte e proliferazione cellulare

L'attivazione aberrante di WNT contribuisce all'insorgenza di molte neoplasie; recentemente è emerso però che in alcuni tumori, come nel MB, nel coriocarcinoma e nel retinoblastoma, β -catenina nucleare ha valore prognostico positivo. ^[26,54,55] Sebbene l'accumulo intracellulare di β -catenina sia generalmente associato a proliferazione, evasione dall'apoptosi, fenotipo staminale, invasione e metastatizzazione stanno accumulandosi evidenze sperimentali del fatto che esso possa anche indurre apoptosi e/o inibizione della crescita simile a senescenza. ^[50,55-57] Il ruolo di β -catenina nell'apoptosi è ampiamente dibattuto e comunque sembra essere dipendente dal tipo cellulare; la sua iperespressione o stabilizzazione protegge infatti alcune cellule, come ad esempio i neuroni cerebellari maturi dall'apoptosi, ma in altri tipi cellulari, quali i granuli cerebellari immaturi, ha esattamente l'effetto opposto e induce la morte cellulare programmata. ^[57] La β -catenina induce apoptosi nei neuroni della retina di *Drosophila* ^[58], nella linea murina NIH3T3 e in quella umana H1299 mentre la sua stabilizzazione da parte della presenilina-1, frequentemente mutata nei

pazienti con Alzheimer familiare, protegge i neuroni dall'apoptosi. ^[49] Il knock-down funzionale di β -catenina nelle cellule HeLa, derivate da cancro della cervice uterina, mediante RNA interference, rende le cellule più sensibili all'apoptosi e l'analisi con microarray contenenti 1384 geni correlati all'apoptosi mostra come 130 di questi mostrino alterata espressione in seguito al knockdown. ^[59] I meccanismi molecolari attraverso cui β -catenina sarebbe in grado di svolgere un ruolo pro-apoptotico sono attualmente oggetto di studio. Kim K e collaboratori ^[58] affermano che alti livelli di β -catenina esogena provocano apoptosi in fibroblasti murini embrionali (MEFs, Mouse Embryo Fibroblasts) e linee tumorali di diversa origine (SW480, HCT116, DLD1, SW48, HeLa e M619), che tale effetto è conseguenza diretta dell'aumento di β -catenina piuttosto che una risposta compensatoria secondaria all'attivazione della ciclina D1, che sono gli elevati livelli di proteina ad essere critici piuttosto che la sua localizzazione nucleare poichè la β -catenina endogena a bassi livelli anche se nucleare non induce apoptosi, che la funzione pro-apoptotica di β -catenina non è legata al suo ruolo nella trascrizione e infine che il meccanismo con cui β -catenina induce apoptosi è indipendente da p53. ^[58] In un altro lavoro, condotto su linee cellulari di cancro del colon e su colture primarie e non immortalizzate di MEFs, p53 appare invece cruciale nell'indurre morte cellulare programmata in seguito a trattamenti vari che inibiscono GSK-3 β e quindi stabilizzano β -catenina. ^[60] In linee cellulari di condrociti e di osteosarcoma umano (T/C28a e Saos2) prive di p53 funzionante, trattate con un inibitore del proteasoma (MG132) è stata osservata induzione di apoptosi p53-indipendente associata ad aumento sia del fattore pro-apoptotico Noxa sia di β -catenina trascrizionalmente attiva che sembrano però svolgere ruoli indipendenti nel promuovere la morte cellulare programmata. ^[56] L'iperespressione di una forma non degradabile di β -catenina o l'inibizione della degradazione della β -catenina endogena in linee epiteliali normali e trasformate porta ad arresto del ciclo cellulare in fase G2 da cui poi le cellule vanno in apoptosi. ^[61] Tra i geni target di

β -catenina vi sono c-myc e ciclina D1 coinvolti tradizionalmente nella proliferazione cellulare ma in grado anche di agire da induttori dell'apoptosi. [57,58] Un'altra possibilità è che β -catenina inibisca la segnalazione NF- κ B implicata nella sopravvivenza cellulare. [62] Il ruolo apoptogeno di β -catenina, come è già stato accennato, potrebbe essere mediato da p14^{ARF} coinvolto in meccanismi sia p53-dipendenti che p53-indipendenti. ARF è indotto da segnali iperproliferativi/oncogenici trasdotti da proteine come c-myc, Ras, E2F, E1A, v-Abl e β -catenina. Il pathway principale attraverso cui ARF agisce è l'asse ARF–MDM2-p53 ma ha anche un'attività oncosoppressiva indipendente da p53 e MDM2. [63] ARF è inoltre in grado di regolare c-myc in modo singolare poiché inibisce la sua capacità proliferativa mentre stimola quella pro-apoptotica; anche questa attività di ARF è del tutto indipendente da p53. [64] Tra i principali mediatori dell'apoptosi p53-indipendente stimolata da ARF sembrano esserci Bax [65] e CtBP un repressore trascrizionale la cui degradazione viene indotta da ARF. [66] Tra i geni target del pathway WNT/ β -catenina vi è WISP-1 (*WNT-1 Induced Secreted Protein*) in grado di attivare il pathway anti-apoptotico di Akt, ostacolare il rilascio del citocromo *c* dal mitocondrio, up-regolare il fattore anti-apoptotico Bcl-XL e quindi prevenire l'apoptosi p53-dipendente indotta da danno al DNA. WISP-1 non è in grado però di inibire l'apoptosi p53-indipendente. [67]

L'effetto antiproliferativo di β -catenina può attuarsi anche come inibizione della crescita anziché apoptosi. E' stato osservato infatti, in MEFs wild-type, che l'iperespressione di β -catenina non degradabile inibisce la proliferazione e porta a senescenza cellulare. Ciò non accade in assenza di ARF o p53 condizioni in cui gli elevati livelli di β -catenina promuovono invece la proliferazione e la trasformazione neoplastica. [50]

Da quanto detto finora emerge che, in alcune situazioni specifiche, β -catenina deregolata non rappresenta una “minaccia” tumorigenica ma al contrario induce apoptosi p53-dipendente e/o –indipendente o

arresto della crescita. Il quadro generale è tuttavia ancora piuttosto confuso e i risultati spesso sono discordanti anche in modelli sperimentali sovrapponibili.

Per quanto riguarda la regolazione di β -catenina durante il ciclo cellulare uno studio condotto su cellule epiteliali sincronizzate ha rilevato che i livelli della proteina cominciano ad aumentare in fase S, raggiungono il massimo in fase G2/M quindi calano bruscamente non appena le cellule entrano in fase G1. In parallelo è stato osservato che in fase S e in fase G2 aumentano i livelli di proteina localizzata nel citoplasma e nel nucleo. L'iperespressione di una forma stabile della proteina o l'inibizione della degradazione della β -catenina endogena inducono arresto in fase G2 seguito da apoptosi. Tali risultati fanno supporre che, almeno in cheratinociti epidermici, β -catenina abbia un ruolo nel controllo del ciclo cellulare e nell'apoptosi successiva ad arresto in G2/M. ^[61] Fibroblasti embrionali trasformati di ratto e topo trattati con sodio butirato, un inibitore delle istoni-deacetilasi, mostrano blocco del ciclo in fase G1/S anche in cellule $p21^{waf1-/-}$ e accumulo di β -catenina non fosforilata indicando come l'inibizione della crescita indotto dal sodio butirato possa essere indipendente dal pathway canonico p53/ $p21^{waf1-/-}$ e possa, almeno in parte, essere dovuto alla stabilizzazione della β -catenina. ^[68] Il trattamento porta a down-regolazione di geni target di β -catenina come c-myc e ciclinaD1 nonché di geni come e2f1 e cdc25A coinvolti nella regolazione dei checkpoint cellulari e la cui ridotta espressione porta ad arresto del ciclo in fase G1/S. La modulazione dell'espressione genica da parte del sodio butirato sembra comunque dipendere dal tipo cellulare. ^[68] Recentemente è stato mostrato inoltre come β -catenina legghi il fattore di trascrizione FOXO e aumenti la sua attività che consiste nell'inibire la progressione del ciclo cellulare. ^[69] β -catenina sembra quindi essere coinvolta nella regolazione dei principali checkpoint cellulari ed essere in grado di promuovere non solo la progressione ma anche l'arresto del ciclo a seconda del tipo cellulare. Per questa proteina multifunzionale ed estremamente versatile è stato di recente

identificato un ruolo anche nella formazione del fuso mitotico che consiste nel garantire la corretta separazione dei due centrosomi e quindi la formazione di un fuso bipolare. ^[70]

3. La risposta cellulare alle Radiazioni Ionizzanti (RI)

3.1 Generalità

La radioterapia rimane una componente chiave dei moderni regimi terapeutici anti-neoplastici. Dopo un secolo di prove empiriche, i protocolli di radioterapia oncologica esistenti sono notevolmente ottimizzati e difficilmente potranno essere ulteriormente migliorati. Ci si aspetta ora che gli avanzamenti derivino dall'implementazione delle conoscenze sui meccanismi molecolari alla base della risposta cellulare alle RI. E' noto come le RI attivino diversi meccanismi molecolari di soppressione della crescita tumorale: arresto del ciclo cellulare, induzione della senescenza, dell'apoptosi, del differenziamento terminale e della catastrofe mitotica (figura 3). Dati recenti mostrano che molti se non tutti i pathway molecolari che mediano questi fenomeni sono strettamente interconnessi (figura 4). Rimane tuttavia da chiarire quale sia il contributo delle singole modalità e il significato delle interrelazioni reciproche nell'eradicazione del tumore, anche se appare ormai chiaro quanto sia improbabile che una singola modalità determini l'esito della radioterapia. ^[71]

Le RI sono radiazioni corpuscolate (particelle α , β cariche elettricamente, neutroni, protoni, nuclei di Elio e Carbonio, ecc) 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. Semplificando

notevolmente, possiamo paragonare la cellula ad una soluzione acquosa, gli effetti che si producono a seguito di interazione con le RI sono conseguenti quindi a:

- Azione diretta sulle molecole del soluto, la radiazione danneggia il DNA cellulare;
- Azione indiretta, conseguente all'interazione dei prodotti derivati dalla radiolisi dell'acqua con le molecole del soluto.

I raggi X e γ pur essendo molto penetranti si possono considerare a bassa densità di ionizzazione; le radiazioni corpuscolate α , β e neutroniche, meno penetranti, i protoni e i nuclei di Elio e Carbonio sono da considerarsi ad alta densità di ionizzazione.

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 Gy = 1 joule di energia assorbita da un chilogrammo di materia

La probabilità di danno non dipende soltanto dalla dose assorbita ma anche dalla qualità della radiazione, pertanto 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/ μ m). 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 antitetiche hanno le radiazioni a basso LET: quindi un diverso LET conduce, a parità di dose, ad effetti biologici diversi. Particelle ad alto LET sono più dannose, per unità di dose, che le radiazioni a basso LET. Con basso LET si ha recupero, mentre non lo si osserva per alto LET. Le particelle α , β e i neutroni sono radiazioni ad alto LET mentre i raggi X e γ sono a basso LET. I raggi γ originano da nuclei eccitati ed instabili mentre i raggi X sono prodotti dalla transizione di elettroni da

un livello energetico ad un altro all'interno di un atomo o dalla decelerazione di elettroni ad alta energia cinetica.

Il bersaglio principale delle RI è costituito dal DNA il che giustifica il loro potere mutageno e cancerogeno. Il danno al DNA consiste principalmente in rotture a singolo (*Single-Strand Breaks*, SSB) o 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.^[72] I DSB 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 DSB può portare a mutazioni o riarrangiamenti genomici nelle cellule sopravvivenenti e quindi a instabilità genetica e probabile trasformazione maligna.^[73]

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. Generalmente in clinica si utilizzano frazioni multiple erogate alla sede tumorale di 180-200 cGy (frazionamento convenzionale). Il frazionamento delle dosi ha significativamente aumentato l'effetto antitumorale rispetto alla singola applicazione poiché ha permesso di raggiungere dosi cumulative più elevate limitando i danni ai tessuti sani. La suddivisione di una dose in due o più frazioni, separate da un intervallo di tempo, spesso provoca infatti un danno biologico minore di quello prodotto da una irradiazione in un'unica dose elevata. Nonostante tutte le precauzioni prese per minimizzare l'esposizione delle cellule normali è impossibile risparmiarle completamente; è necessario infatti irradiare anche l'area che circonda immediatamente la massa tumorale vista la natura invasiva della crescita di quest'ultima.

3.2 La risposta biologica alle RI

La risposta delle cellule di mammifero alle RI è un processo complesso e attivo che coinvolge numerosi geni e l'esatta combinazione di essi determina l'esito finale. Un ulteriore grado di complessità viene raggiunto se si considera il tessuto o l'organismo intero a livello dei quali si integrano molteplici risposte cellulari. La presenza di RI ha accompagnato gli organismi nell'evoluzione e questo ha fatto sì che si siano sviluppati numerosi meccanismi difensivi atti a ridurre le conseguenze negative delle radiazioni e ad aumentare le probabilità di sopravvivenza ad esse. Le strategie difensive sono diverse a seconda che si tratti di organismi uni- o multicellulari. Negli organismi unicellulari, come ad esempio i lieviti, la probabilità di sopravvivere alle RI dipende unicamente dalla capacità della cellula singola di riparare il danno. In risposta al danno si ha quindi l'arresto del ciclo cellulare per permettere il riparo del DNA prima di procedere alla mitosi. Se il danno fosse irreparabile la cellula morirebbe per inattivazione dei geni delle vie metaboliche principali o per incapacità di trasmettere con successo il materiale genetico alle cellule figlie. Negli organismi multicellulari la risposta alle RI è complicata dal fatto che il soggetto della selezione non è la singola cellula, ma l'organismo intero. La salvaguardia di un tessuto dipende principalmente dalla sopravvivenza delle sue cellule staminali in grado di determinarne la rigenerazione piuttosto che da quella delle sue cellule differenziate perciò la difesa di queste ultime è meno cruciale. La sopravvivenza delle cellule differenziate danneggiate potrebbe portare all'accumulo di numerose cellule mutate, il che aumenterebbe il rischio per l'organismo di sviluppare un cancro. 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. Nel corso dell'evoluzione sono comparsi livelli di controllo ulteriori

sostanzialmente incentrati sull'oncosoppressore p53, molecola chiave della risposta delle cellule di mammifero allo stress genotossico. Questi meccanismi di controllo aggiuntivi servono sia a prolungare l'arresto ai vari checkpoint cellulari sia ad eliminare le cellule danneggiate per apoptosi o per arresto irreversibile della crescita e sono accuratamente coordinati in modo da eliminare cellule con mutazioni pericolose e da evitare al tempo stesso la perdita di troppe cellule. Tale coordinazione viene spesso a mancare nelle cellule tumorali le quali tendono a perdere la funzionalità di p53 e quindi il meccanismo di controllo naturale del "comportamento sociale" e a ritornare alle modalità che governano la sopravvivenza degli organismi unicellulari. [72] I checkpoint cellulari sono essenziali per la sopravvivenza della cellula e dell'organismo in toto e servono non solo come sorveglianza in presenza di danni occasionali ma anche come agenti regolatori della normale fisiologia cellulare. [74]

Il network di pathway molecolari che interviene nella risposta al danno da RI comprende sensori, mediatori, trasduttori ed effettori (figura 5). Le proteine che per prime riconoscono la presenza di una struttura aberrante del DNA non sono del tutto note [74] anche se studi recenti condotti sia in lieviti che in mammiferi hanno dimostrato che Rad9, Rad1, Hus1 e Rad17 sono essenziali nell'attivare la risposta. [75] Nell'uomo, come nel lievito, Rad9, Rad1 e Hus1 formano un eterotrimerico, il complesso 9-1-1, con struttura simile al PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Rad17 forma invece un complesso con quattro piccole subunità, i fattori di replicazione C (*Replication Factor C*, Rfc) Rfc2, Rfc3, Rfc4 e Rfc5. Il complesso 1-1-9 viene reclutato nel sito danneggiato e lega la cromatina in modo regolato dal complesso di Rad17. [76] Nei mammiferi sono stati scoperti alcuni mediatori tra cui ricordiamo: 53BP1 (*p53 binding protein 1*), MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*), TopBP1 (*topoisomerase binding protein 1*) e BRCA1 (*breast cancer susceptibility gene 1*). [53] Il reclutamento di tali proteine che formano dei "foci" microscopicamente visibili dipende dalla fosforilazione di

γ H2AX da parte di ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), una modifica che marca regioni di cromatina che si espandono per alcuni megadalton a partire dai siti di DSB. ^[77-81] Nei mammiferi i segnali iniziati dai sensori vengono rapidamente trasdotti dalle chinasi ATM e ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad-3-related*) che fosforilano un gran numero di substrati. ATM attivata fosforila BRCA1, NBS1, Chk2, MDM2 e p53. In condizioni di assenza di stress ATM esiste come omodimero in cui il dominio chinasi è fisicamente bloccato; i DSB inducono un cambiamento conformazionale del dimero che porta alla fosforilazione della Ser1981 di ciascun monomero e alla dissociazione del dimero. Tale sequenza di eventi non sembra richiedere l'interazione diretta di ATM con il sito di DNA danneggiato ma dipende da qualche cambiamento nella struttura altamente ordinata della cromatina conseguente al danno. I dettagli sulla natura di tali cambiamenti e il modo in cui essi vengano riconosciuti da ATM non sono ancora stati chiariti. ^[81] Contrariamente a quanto avviene per topi knock-out per ATM, i topi senza ATR non sopravvivono e mutazioni che inficiano solo parzialmente l'attività di ATR sono state associate alla condizione autosomica recessiva nota come sindrome di Seckel. ^[82] L'espressione di un dominante negativo di ATR sensibilizza le cellule di mammifero a tutte le forme di danno genotossico e riduce il blocco G2/M indotto dai raggi γ . ^[74] Diversamente da quanto accade per ATM, ATR è costitutivamente pronta a fosforilare i suoi substrati. Nelle cellule umane ATR esiste in un complesso stabile con la proteina ATRIP (*ATR-interacting protein*) un partner con verosimili funzioni regolatorie. ^[83,84] ATM e ATR fosforilano Chk1 (*checkpoint kinase 1*) e Chk2 : (*checkpoint kinase 2*) due serin/treonin chinasi strutturalmente diverse ma con alcuni substrati in comune. ^[74] Studi condotti su topi knock-out ^[85,86] mostrano come la chinasi Chk1 sia essenziale per l'attivazione dei checkpoint cellulari in risposta al danno genotossico. Nei mammiferi come nei lieviti, Chk1 viene fosforilata a livello di Ser317/345; ciò è impedito in assenza di ATR ^[86] e fortemente inibito in cellule con un contenuto ridotto di Rad17

^[87] o senza Hus1 ^[88] suggerendo un meccanismo, conservato nell'evoluzione, in cui i sensori regolano la fosforilazione di Chk1. Mentre i lieviti con Chk1 mutato sono vitali e apparentemente normali in assenza di danno al DNA, topi senza Chk1 muoiono in uno stadio embrionale precoce presentando spiccate anomalie a livello dei nuclei cellulari; tali dati suggeriscono che Chk1 nei mammiferi svolga un ruolo importante nel corso di tutto il ciclo cellulare. ^[81] Cellule ES (*Embryonic Stem cells*) condizionali per l'espressione di Chk1 muoiono per apoptosi p53-indipendente dopo la perdita di Chk1. Subito prima di morire le cellule sono incapaci di prevenire l'ingresso in mitosi in risposta alle RI dimostrando come, nei mammiferi, Chk1 sia richiesto per il checkpoint G2/M. ^[89] Sembra invece che Chk2 non sia indispensabile per lo sviluppo prenatale e per l'arresto del ciclo cellulare ai checkpoint in risposta a stress genotossico. ^[85,86] Chk2 è comunque implicato nella risposta alle RI: viene infatti fosforilato da ATM a livello del residuo di serina in posizione 68. Mutazioni germinali di Chk2 presenti in eterozigosi sono state trovate in un sottogruppo di pazienti con sindrome di Li-Fraumeni e p53 wild-type. ^[89] Chk1 fosforila Cdc25-A, Cdc25-B e Cdc25-C. Chk2 oltre a Cdc25-A e Cdc25-C fosforila anche BRCA1 e p53 (Ser20). ^[81] Il ruolo di Chk2 nell'arresto del ciclo cellulare in seguito a danno è controverso. Da studi condotti su topi knock-out per Chk2 emerge come l'enzima sia principalmente coinvolto nell'apoptosi p53-dipendente piuttosto che nell'arresto del ciclo in G2/M successivo al danno. ^[90] D'altra parte cellule ES mutanti "null" per Chk2 si sono dimostrate difettive nel mantenere, ma non nell'iniziare, l'arresto in G2 in risposta alle RI. ^[91] Come è già stato accennato, p53 svolge un ruolo fondamentale nel determinare il destino cellulare in seguito a stress di varia natura tra cui danno genotossico, ipossia, attivazione di oncogeni. ^[44] I livelli intracellulari e l'attivazione della proteina sono regolati da modificazioni post-traduzionali come fosforilazioni, sumoilazioni e acetilazioni. ^[92] In assenza di stress i livelli di p53 sono mantenuti bassi e stazionari per azione di MDM2. ^[93] In seguito a danno

genotossico il dominio di trans-attivazione di p53 viene fosforilato in diversi siti tra cui Ser15 e Ser20. ^[94] ATM e ATR fosforilano p53 in Ser15 inibendo la sua interazione con MDM2 e quindi stabilizzandola. ATM inoltre fosforila MDM2 riducendo la sua capacità di trasportare p53 dal nucleo al citoplasma. ^[95] P53 è essenziale per l'arresto in G1 in risposta a danno al DNA, funzione mediata da p21^{CIP1/WAF1} un inibitore delle Cdk (*Cyclin Dependent Kinases*) il cui gene è un bersaglio di p53. p21^{CIP1/WAF1} inibisce l'attività del complesso ciclina E-Cdk2 inibendo la transizione G1-S. ^[44] p21^{CIP1/WAF1} inoltre lega il complesso ciclina D-Cdk4 e impedisce la fosforilazione di Rb da parte del complesso sopprimendo così il pathway RB/E2F. L'attivazione del checkpoint G1/S coinvolge quindi i due pathway oncosoppressori che più spesso sono deregolati nelle neoplasie umane. Cellule mancanti di p21^{CIP1/WAF1} sono comunque in grado di iniziare il blocco in G1 indicando che in questo processo debba essere coinvolto un pathway alternativo. ^[96] E' stato infatti di recente individuato un pathway indipendente da p53 che coinvolge Cdc25A: in seguito a danno genotossico si ha rapida fosforilazione, ubiquitinazione e degradazione preteasomica di questa fosfatasi richiesta per la progressione cellulare dalla fase G1 alla fase S. La diminuzione di Cdc25A sopprime l'attivazione di Cdk2, che avviene per defosforilazione, e blocca il caricamento di Cdc45, una proteina richiesta per l'inizio della replicazione del DNA, sulla cromatina. ^[97] Cdc25A è responsabile di un blocco più precoce, ma meno prolungato, rispetto a quello sostenuto da p53-p21^{CIP1/WAF1}. ^[98,99] Anche la degradazione di ciclina D1 sembra aver un ruolo nell'iniziare l'arresto in G1 poiché è accompagnata dal rilascio di p21^{CIP1/WAF1} dal complesso Cdk4-Ciclina D1 così che p21^{CIP1/WAF1} sia libero di esercitare il suo effetto inibitorio su Cdk2-ciclina E. ^[100] Inizialmente si riteneva che Cdc25C fosse il principale effettore del checkpoint G2/M tuttavia lavori recenti hanno riportato che cellule mancanti di Cdc25C e Cdc25B si arrestano normalmente in G2 suggerendo che Cdc25A sia il protagonista anche

del checkpoint G2/M. L'inattivazione di Cdc25A comporta accumulo di Cdc2 fosforilata in Tyr15 e arresto mitotico.^[101,102]

3.3 La scelta tra apoptosi e blocco del ciclo cellulare

Il fatto che esistano risposte alternative alle RI (figura 3) indica che debbano esistere meccanismi di controllo che “decidono” tra le opzioni in base al tipo cellulare, allo stato della cellula, alla severità del danno e alle condizioni ambientali. La decisione tra apoptosi e arresto della crescita sembra essere ampiamente determinata da p53. Per alcune tipologie cellulari non sembra in realtà esserci scelta e la risposta è predeterminata. Cellule di origine emopoietica o cellule embrionali precoci rispondono alle RI solo andando in apoptosi. D'altra parte i fibroblasti non vanno in apoptosi anche a dosi elevate di RI ma vanno incontro ad arresto prolungato della crescita. Vi sono però molti altri sistemi cellulari per i quali la scelta tra apoptosi e blocco esiste: la decisione dipende dalle condizioni di crescita e dalla gravità del danno.^[103] Sono stati proposti diversi modelli per spiegare come le cellule possano scegliere tra morte e blocco del ciclo in risposta all'attivazione di p53. Secondo un primo modello la decisione dipende dalla quantità di p53 attivata e dalla durata della sua attivazione: più è sostenuta e prolungata l'attivazione di p53 più è probabile che la cellula vada in apoptosi. Questo modello assegna a p53 il ruolo di giudice della gravità e della riparabilità del danno: danni più estesi indurrebbero più p53 e danni persistenti manterrebbero p53 costantemente attiva. Un secondo modello suggerisce che l'esito sia predeterminato dallo spettro di geni responsivi a p53 disponibili per la modulazione: differenti lineage cellulari potrebbero avere set diversi di geni responsivi a p53 nella frazione di cromatina attiva. Pertanto, secondo questo modello, è più probabile che tipi cellulari con più geni pro-apoptotici potenzialmente attivi vadano in apoptosi piuttosto che in arresto della crescita cellulare. Secondo un ulteriore modello la scelta tra apoptosi e blocco del ciclo dipenderebbe dalla disponibilità di co-fattori che

regolerebbero la capacità di p53 di legare un sottogruppo specifico di geni bersaglio piuttosto che un altro. Tutti i meccanismi citati sono supportati da dati sperimentali ottenuti in modelli diversi e sembra pertanto che tutti intervengano nella regolazione della risposta p53-mediata al danno da RI. ^[72] Il destino di una cellula che in seguito a danno non è andata in apoptosi dipende dalla capacità di riparare il danno (figura 3). Il successo di tale processo dipende da molti fattori tra cui la severità del danno, l'efficienza dei meccanismi di riparo e la disponibilità di tempo per riparare. L'efficacia del riparo dipende poi dal momento del ciclo cellulare: la fase generalmente più sensibile è la mitosi quando la cromatina è soggetta a forti stress torsionali e quando le rotture del DNA hanno meno probabilità di essere riparate prima della segregazione dei cromosomi. La fase di massima resistenza invece varia da una linea cellulare all'altra: la fase S è la più resistente nella maggior parte delle cellule probabilmente perché il complesso di proteine deputato alla replicazione del DNA è accoppiato a quello che interviene nel riparo. Il tempo necessario per il riparo è garantito da un temporaneo arresto del ciclo cellulare indotto dal danno. ^[72] Il ruolo di p53 nella sopravvivenza cellulare dopo trattamento con RI varia a seconda che essa agisca come fattore inducente l'arresto della crescita o l'apoptosi. Nelle cellule che vanno incontro ad un prolungato arresto della crescita p53-dipendente in seguito a RI è verosimile che p53 faciliti un efficace riparo del DNA. In diversi modelli cellulari è stato riscontrato un aumento di radiosensibilità associato alla perdita di funzionalità di p53 ma in molti altri casi, invece, tale perdita è stata associata ad aumento della radioresistenza. ^[104-106] E' stato inoltre dimostrato che p53 può modulare il riparo in maniera ciclo cellulare specifica ovvero contribuire all'attivazione del riparo in fase G1/G0 e alla sua inibizione a favore di una risposta apoptotica in fase G2. ^[107] Emerge pertanto quanto la risposta alle RI p53-mediata sia complessa e soprattutto tipo cellulare specifica. ^[104-106,108-110] In conclusione il successo del processo di riparazione del danno indotto da RI dipende dal tipo cellulare, dalla fase del ciclo cellulare e dalla capacità della

cellula di “prendersi” il tempo necessario a riparare il danno. La richiesta di riparo e i criteri per stabilirne il successo sono piuttosto diversi per le diverse cellule di un organismo e dipendono dal loro tasso di proliferazione. Ad esempio rotture cromosomiche non riparate sono letali per cellule in divisione, ma possono essere perfettamente tollerate da cellule quiescenti. L’esempio più eloquente è costituito dal tessuto cerebrale che è il più radioresistente nell’adulto mentre è il più radiosensibile nell’embrione. ^[72]

Le cellule che sfuggono all’apoptosi dopo danno da RI esteso e irreparabile hanno due opzioni: andare in catastrofe mitotica quindi morire o rimanere vive, ma in arresto irreversibile della crescita (figura 3) Per catastrofe mitotica si intende una serie di eventi patologici che si verificano in seguito a mitosi aberranti e che generalmente sfociano nella morte della cellula. Mitosi aberranti non portano a segregazione cromosomica e divisione cellulare, ma a formazione di cellule non vitali grandi, contenenti molti nuclei e frammenti di cromosomi. ^[72]

L’arresto irreversibile della crescita cellulare è p53-dipendente e p21^{CIP1/WAF1} è un fattore essenziale perché esso si instauri. ^[111,112] E’ stato inoltre osservato che il mantenimento di un arresto permanente dipende dalla presenza costante di specie reattive dell’ossigeno. ^[113]

3.4 Suscettibilità dei tumori alle RI

Così come l’apoptosi p53-dipendente avviene solo in alcuni tessuti specifici, la suscettibilità dei tumori all’apoptosi potrebbe dipendere dal loro tessuto di origine. Questa ipotesi è stata corroborata dallo studio di Kemp e collaboratori che confronta la risposta apoptotica in tumori primari murini sviluppatasi a partire da tessuti diversi. Questo lavoro conclude che i trattamenti antineoplastici con chemioterapici o RI possono indurre apoptosi nel tumore solo se questo origina da tessuti suscettibili all’apoptosi p53 dipendente. ^[114] Studi clinici indicano che la morte per apoptosi in risposta al trattamento

antineoplastico è caratteristica di tumori che originano dal tessuto emopoietico e riproduttivo noti per essere naturalmente pronti all'apoptosi. Per molti altri cancro i livelli di apoptosi non correlano con la diminuzione della sopravvivenza clonale e con la prognosi favorevole. P53, inoltre, è inattivata per mutazione in più della metà dei cancro umani e non è funzionale in molti altri per via di alterazioni in altre componenti del pathway di p53 il che riduce ulteriormente la frazione di tumori umani in cui l'apoptosi p53 dipendente ha un ruolo. ^[115,116] Persino i tumori che mantengono nelle fasi iniziali un pathway p53 funzionante frequentemente perdono i meccanismi apoptotici progredendo verso la proliferazione incontrollata e l'indipendenza da meccanismi di inibizione della crescita intrinseci o estrinseci. La resistenza all'apoptosi, ad esempio, si instaura per iperespressione di membri anti-apoptotici della famiglia Bcl2, come Bcl2 e BclXL, o per perdita di importanti componenti del "macchinario" apoptotico, come ad esempio il silenziamento trascrizionale di APAF1 che avviene nel melanoma o l'inibizione di geni codificanti per le caspasi. ^[117,118] I tumori spesso perdono anche la sensibilità agli stimoli pro-apoptotici esterni (come FAS, TNF e TRAIL) come strategia per sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite. ^[119] In conclusione, sebbene l'apoptosi possa essere un fattore importante nel determinare la suscettibilità dei tumori ai trattamenti antineoplastici negli stadi più precoci della progressione tumorale, essa ha un ruolo modesto nella maggior parte dei tumori quando questi perdono i loro meccanismi pro-apoptotici. Il processo di inattivazione di p53, con conseguente resistenza all'apoptosi, avviene spontaneamente in un'elevata percentuale di tumori sperimentali murini che erano originariamente sensibili come parte naturale del fenomeno di selezione delle varianti più maligne. ^[120] Se non è l'apoptosi cosa determina la sensibilità dei tumori alle RI? Si stanno accumulando prove del fatto che questo ruolo sia svolto dal fenomeno della catastrofe mitotica. Nell'ambito di una popolazione tumorale, nelle normali condizioni di crescita, le cellule che perdono i meccanismi di controllo dei checkpoint cellulari

hanno un vantaggio selettivo e si accumulano grazie all'elevato tasso di proliferazione. Tuttavia, in presenza di danno genotossico da chemio- o radioterapia, tali caratteristiche possono trasformarsi nel "tallone di Achille" del tumore. Perdere il controllo dei checkpoint significa non essere in grado di arrestarsi per il tempo necessario a riparare il danno così le cellule entrano in mitosi danneggiate e vanno incontro a catastrofe mitotica. G2/M è il checkpoint cruciale nel prevenire l'ingresso in mitosi di cellule con DNA danneggiato e non riparato e, pertanto, cellule in questa fase del ciclo cellulare sono estremamente sensibili alle RI. Il tipico regime radioterapeutico per pazienti oncologici prevede il frazionamento della dose in trattamenti multipli ad intervalli di 24 ore. Questo permette ai fisici di aumentare l'efficacia del trattamento sfruttando le differenze a livello del controllo dei checkpoint tra le cellule normali e tumorali. Il danno arrecato da ogni singola dose è relativamente limitato e potenzialmente riparabile se le cellule si arrestano ad uno dei checkpoint. L'incapacità di arrestarsi rende le cellule tumorali più suscettibili alla catastrofe mitotica. La catastrofe mitotica rappresenta la causa di morte preponderante in molte linee cellulari trattate con agenti genotossici, incluse le RI. Di quattordici linee derivate da tumori solidi solo due mostrano una prevalente risposta apoptotica, mentre le altre dodici rispondono andando in catastrofe mitotica ^[121] con o senza apoptosi. Vale la pena precisare che catastrofe mitotica ed apoptosi non sono fenomeni mutuamente esclusivi; la catastrofe mitotica è spesso seguita da apoptosi in cellule apoptosi-competenti. ^[122,123] In cellule non apoptosi-competenti, p53 wild-type potrebbe agire da fattore di sopravvivenza, riducendo il tasso di catastrofe mitotica post-RI e tenendo le cellule in un prolungato arresto della crescita facilitando perciò il riparo del DNA. Ciò è risultato vero in molte linee cellulari: il knockout di p53 nella linea HCT116 derivata dal cancro del colon porta a sensibilizzare la linea ai trattamenti antineoplastici. ^[104] Un aumento significativo del numero di cellule che vanno in catastrofe mitotica è stata osservata anche nelle cellule di fibrosarcoma umano

HT1080 nelle quali p53 endogena wild type era stata inattivata da un mutante dominante negativo. ^[121] Il ruolo di p53 nella suscettibilità dei tumori ai trattamenti non è semplice come si potrebbe pensare: il valore diagnostico e prognostico di p53 dipende da molti fattori e deve essere valutato nel contesto dello specifico tumore considerato. E' ormai chiaro, comunque, che in molti casi la perdita di p53 non si associa ad un aumento della resistenza, ma al contrario è un fattore che contribuisce alla chemio- e radiosensibilità. ^[72]

3.5 Ruolo di β -catenina nella risposta alle RI

Ad oggi non è noto se β -catenina abbia una funzione nella risposta cellulare alle RI. Un lavoro condotto su cellule epiteliali canine non trasformate trasfettate con β -catenina non degradabile riporta come essa riduca il blocco G1/S indotto da raggi γ . ^[124] Un altro lavoro mostra che linee di medulloblastoma, tra cui le DAOY e le D283MED, vanno in apoptosi in seguito a trattamento con RI. Linee con p53 wild-type, come le D283MED, vanno più in apoptosi rispetto a linee con p53 mutata. Questo studio mostra inoltre come l'inattivazione di p53 in linee wild-type ottenuta introducendo un dominante negativo della proteina diminuisca il tasso di apoptosi indotto da radiazioni. ^[125]

SCOPO DELLA TESI

Il medulloblastoma è considerato un tumore radiosensibile e la totalità dei protocolli terapeutici convenzionali prevede cicli di radioterapia nel trattamento del paziente. Risulta, però, difficile prevedere la risposta terapeutica e si sente la necessità di affiancare nuovi fattori prognostici a quelli già utilizzati per migliorare la stratificazione del rischio, al fine di minimizzare la tossicità legata alla terapia senza compromettere l'efficacia terapeutica del trattamento. ^[7] C'è grande consenso nel ritenere che solo dall'implementazione delle conoscenze sulla biologia del MB, dei meccanismi molecolari implicati nella patogenesi e nella risposta alle terapie esistenti possa derivare un miglioramento del management clinico del paziente non solo consentendo di predire più accuratamente i rischi, ma anche permettendo di sviluppare terapie individualizzate che combinino trattamenti convenzionali e terapie innovative mirate a precisi target molecolari. ^[7,131]

E' stato recentemente attribuito alla presenza di β -catenina nucleare, indicativa di attivazione del sistema WNT, il ruolo di fattore prognostico positivo nel MB. ^[26] E' stato inoltre evidenziato che β -catenina ha funzioni antitetiche e tessuto/tumore specifiche essendo in grado di promuovere proliferazione e progressione tumorale in determinati contesti ^[26,42,43,126,127-130], mentre in altri è capace di indurre apoptosi o arresto della crescita simile a senescenza, con modalità sia p53-dipendenti che p53-indipendenti. ^[26,49,50,54-58,60,61,67,124]

Scopo della tesi è pertanto quello di chiarire il ruolo di β -catenina nella progressione del ciclo, nella morte cellulare e nei meccanismi di risposta al danno genotossico indotto da radiazioni ionizzanti (RI) in linee cellulari derivate da MB umano. Si vuole inoltre valutare l'importanza del crosstalk tra β -catenina e p53 in questo delicato e complesso equilibrio. A tal fine linee di MB sono state sottoposte a RI e ne sono stati valutati gli effetti; nel tentativo di definire il ruolo specifico di β -catenina le cellule sono state inoltre trattate con cloruro

di litio (LiCl) un inibitore di GSK-3 β che mima l'attivazione di WNT inducendo aumento di β -catenina non fosforilata e quindi non degradabile. ^[60,61,135,136]

MATERIALI E METODI

1. Le linee cellulari

Lo studio del sistema WNT è avvenuto su due linee cellulari derivate da MB umano: le DAOY e le D283MED. La prima è una linea ipertetraploide, isolata nel 1985 dal cervelletto di un paziente maschio di 4 anni, affetto da MB desmoplastico; la seconda è una linea ipodiploide, isolata nel 1985 da un paziente maschio di 6 anni, con metastasi di MB nel peritoneo. ^[132] Come controllo sono state utilizzate, nei vari esperimenti, due linee derivate da cancro del colon: le RKO e le SW480; queste due linee cellulari sono state scelte per avere rispettivamente il sistema WNT wild-type e il sistema WNT alterato per la presenza della proteina APC troncata e conseguente accumulo di β -catenina nucleare. ^[133, 134]

Le linee cellulari DAOY e D283MED sono state coltivate in MEM (*Minimum Essential Medium* with earle's salt, Invitrogen Corporation; Frederick, MD) addizionato di 20% di FBS (*Foetal Bovine Serum*, Invitrogen Corporation; Frederick, MD) inattivato al calore, 1% di L-glutamina (Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR), 1% di gentamicina e neomicina (gentamicina 10mg/ml Euroclone, Life Sciences Division, MI; neomicina 10mg/ml Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1% di aminoacidi non essenziali (*Eagle's non essential amino acid*, Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR), 1% di sodio piruvato (Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR).

Le RKO sono state coltivate in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR) addizionato di 10% FBS (*Foetal Bovine Serum*, Invitrogen Corporation; Frederick, MD) inattivato al calore, 1% di L-glutamina (Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR), 1% di gentamicina e neomicina (gentamicina 10mg/ml Euroclone, Life Sciences Division, MI; neomicina 10mg/ml Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO) e 0.5% di aminoacidi non essenziali (*Eagle's non essential amino acid*, Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR).

Le SW480 sono state coltivate in L15 (*Leibovitz Medium*, Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR) addizionato di 10% FBS (*Foetal Bovine Serum*, Invitrogen Corporation; Frederick, MD) inattivato al calore, 1% di L-glutamina (Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR), 1% gentamicina e neomicina (gentamicina 10mg/ml Euroclone, Life Sciences Division, MI; neomicina 10mg/ml Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 0.5% di aminoacidi non essenziali (*Eagle's non essential amino acid*, Eurobio; Courtaboeuf Cedex, FR).

DAOY, RKO e SW480 crescono adese formando un monostrato di cellule epitelioidi, mentre le D283MED crescono sia in adesione, con morfologia tipicamente epiteliale, sia in sospensione, formando aggregati di piccole cellule rotondeggianti. Tutte le linee cellulari sono state ottenute dall'ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas VA).^[132]

2. Il trattamento con radiazioni ionizzanti (RI)

Le cellule, dopo essere state messe in coltura almeno 24 ore prima, sono state irradiate con raggi γ (sorgente ^{137}Cs) alla dose di 6 Gy e dose rate di circa 2 Gy/min, mediante l'utilizzo dell'*Irradiateur Biologique 437C* (CIS-BIO; Cedex, FR). Successivamente le cellule sono state lasciate in coltura per 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 16, 24, 48 o 72 ore a seconda della necessità, al termine delle quali sono stati fatti saggi di vitalità cellulare, curve di crescita, valutazioni del ciclo cellulare e dell'apoptosi, studi di localizzazione e di espressione proteica per valutare diversi aspetti della risposta cellulare alle RI nelle linee di MB. Sono stati effettuati triplicati indipendenti di tutti gli esperimenti.

3. Il trattamento con cloruro di litio (LiCl)

Al fine di evidenziare il ruolo della β -catenina nei fenomeni studiati, le cellule, ad almeno 24 ore dalla semina, sono state trattate con 20mM di LiCl (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO), o 20 mM di NaCl (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) addizionati al terreno di coltura. Dopo 24 ore dal trattamento è stata valutata la quantità di β -catenina totale e nucleare mediante WB e la sua localizzazione cellulare mediante IF. Sono state allestite curve di crescita delle linee trattate e dei relativi controlli (cellule trattate con NaCl 20mM). E' stata determinata la vitalità cellulare e l'induzione di apoptosi in seguito a trattamento con LiCl per 24, 48, 72 e 96 ore. Sono stati effettuati triplicati indipendenti di tutti gli esperimenti.

4. La vitalità cellulare

La valutazione della vitalità cellulare è stata effettuata nelle DAOY e nelle D283MED a 24, 48 e 72 ore dalle RI e a 24, 48, 72 e 96 ore dalla somministrazione di LiCl, utilizzando il saggio di vitalità con *Trypan Blue* (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO).

Ai tempi indicati le cellule sono state staccate, lavate e risospese in PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Calcium and Magnesium*, Euroclone; Life Sciences Division, MI). Un'aliquota di sospensione omogenea è stata miscelata a *Trypan Blue*, con diluizione 1:2, e inserita in una camera di Neubauer per la conta delle cellule morte e di quelle totali al microscopio ottico (Nikon Eclipse TS100, Nikon Instruments s.p.a, FI). Ogni conta è stata effettuata in triplicato.

5. La curva di crescita

Sono state allestite curve di crescita per le due linee di MB, DAOY e D283MED prendendole a 0, 24, 48, 72 e 96 ore dalla messa in coltura con esposizione alle RI o a LiCl dopo 24 ore dalla piastratura.

Il giorno 0 le cellule sono state piastrate in fiasca T25, facendo attenzione ad aggiustare la concentrazione cellulare alla superficie disponibile. Sono state piastrate 200.000 cellule per ciascuna linea cellulare.

Sono state preparate tre fiasche per 4 giorni successivi, quindi in tutto 12 fiasche per linea cellulare. Ogni giorno alla stessa ora sono stati staccati e contati tre campioni in camera di Neubauer. I dati sono stati riportati in scala semilogaritmica con tempo in ascissa e logaritmo del numero di cellule in ordinata: la fase esponenziale appare come una retta. Il tempo di duplicazione necessario alla popolazione per raddoppiare è stato calcolato graficamente. Considerando i punti sulla curva che appartengono alla fase esponenziale, è stato preso un primo punto, A, in cui le cellule hanno una data concentrazione, D, al tempo C (in ore) corrispondente; le cellule raggiungono una concentrazione doppia rispetto a quella precedente, $2 \times D$, al tempo E. Il tempo di duplicazione è dato da E-C.

6. La citofluorimetria

Gli effetti delle RI e del LiCl sulla distribuzione delle popolazioni nel ciclo cellulare e sull'induzione di apoptosi sono stati valutati con tecniche citofluorimetriche. Per il ciclo cellulare sono state preparati campioni di cellule non trattate e trattate dopo 5, 16, 24 e 48 ore dai trattamenti stessi. L'apoptosi è stata valutata dopo 8, 24, 48 e 72 ore.

6.1 Valutazione del ciclo cellulare

Per studiare il ciclo cellulare, le cellule sono state lavate una volta in PBS e successivamente staccate dalle fiasche mediante PBS-EDTA 0.4% e Tripsina 0.05%-EDTA 0.02% in PBS. La sospensione è stata poi centrifugata a 233g per 5' e i pellet cellulari trattati con una soluzione lisante messa a punto da Nusse M. e collaboratori. ^[137] Le cellule sono state trattate prima con la soluzione “DNA Nusse 1” (NaCl 584mg/L, citrato trisodico 1000mg/L, RNasi 10mg/L, Nonidet P40 0.03%) e lasciate in incubazione a 4°C per 30', poi sono state trattate con un uguale volume di soluzione “DNA Nusse 2” (acido citrico 1.5%, saccarosio 0.25M) e, dopo aver ben vortexato, sono state conservate a 4°C fino all'utilizzo (massimo 4 settimane). Al momento delle analisi, i nuclei isolati sono stati colorati con Propidio Ioduro (PI), 50µg/ml, (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) e passati al citofluorimetro (*Bryte HS*; Biorad, Munchen, Germany). La fluorescenza rossa è stata analizzata in scala lineare. Il programma *Modfit* (Verity, U.S.A.) ha permesso di valutare la percentuale di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

6.2 Valutazione dell'apoptosi

Per l'analisi dell'apoptosi è stato utilizzato il *Vybrant Apoptosis Assay Kit* (Molecular Probes, Invitrogen Corporation; Frederick, MD) che si basa sulla somministrazione contemporanea dei coloranti per il DNA YO-PRO (verde) e PI (rosso), caratterizzati da capacità diverse di attraversare la membrana cellulare. Più precisamente, un forte segnale fluorescente sia rosso che verde indica lo stato di necrosi delle cellule, che sono permeabili ad entrambi i coloranti; se invece la fluorescenza verde è alta e quella rossa è bassa indica che le cellule sono in apoptosi, essendo permeabili solo allo YO-PRO; per le cellule vive si ha invece un basso segnale di fluorescenza sia rosso che verde, dato che entrambi i coloranti hanno una scarsa capacità di penetrare la

membrana integra. Sono state seguite le indicazioni della ditta produttrice del kit: le cellule sono state centrifugate a 233g per 5' e i pellet sono stati lavati con PBS freddo. Dopo aver centrifugato nuovamente a 233g per 5', le cellule sono state sospese in PBS freddo in modo da averle ad una concentrazione di 1.000.000 cell/ml. A questo punto sono stati aggiunti 1 μ l di YO-PRO e 1 μ l di PI per ml di campione e i campioni sono stati lasciati in incubazione in ghiaccio per 20', al termine dei quali è avvenuta la lettura al citofluorimetro (*Epics Elite*, laser ad Argon 15 mW con software EXPO; Beckman Coulter, Fullerton, CA) e mediante il programma *Modfit* (Verity, U.S.A.) sono state ricavate le percentuali delle cellule vive, morte e in apoptosi.

7. Il Western Blot (WB)

Gli esperimenti di WB sono stati effettuati al fine di analizzare l'espressione di β -catenina e p53 in linee di MB sottoposte o meno a RI e la quantità di β -catenina in cellule trattate e non con LiCl. Più precisamente sono stati preparati estratti proteici totali di DAOY e D283MED non irradiate e dopo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 16 e 24 ore dalle radiazioni su cui valutare i livelli sia di β -catenina che di p53. Sono stati inoltre preparati estratti proteici nucleari di DAOY e D283MED non sottoposte a radiazioni e dopo 5, 8, 16, 24 ore dalle radiazioni per valutare i livelli di β -catenina nucleare. Estratti proteici totali e nucleari di cellule trattate e non con LiCl sono stati ottenuti a 24 ore dalla somministrazione del composto e analizzati per la presenza e la quantità di β -catenina.

7.1 Preparazione degli estratti proteici totali

Per ottenere l'estratto proteico totale, le cellule sono state lavate due volte con PBS freddo, staccate per mezzo di un cell-scraper tenendo la

fiasca in ghiaccio e quindi la sospensione cellulare in PBS freddo è stata trasferita in una provetta da 15 mL e centrifugata a 771g per 5' a 4°C. Scartato il sovrnatante, il pellet è stato risospeso in 1 mL di PBS e dopo averlo trasferito in provetta da 1,5/2 mL è stato ricentrifugato a 367g per 8' a 4°C. Scartato nuovamente il sovrnatante, al pellet cellulare sono stati aggiunti circa 80-100 µl, a seconda della quantità di pellet, di buffer di lisi (Triton 1%, glicerolo 10%, Tris 50mM pH 7.4, NaCl 150mM, EDTA 2mM pH 8.0, MgCl₂ 2mM) con aggiunta di un cocktail di inibitori delle proteasi *Complete EDTA-free* (Roched Diagnostic, Indianapolis, IN) 2X ed è stato lasciato in incubazione in ghiaccio per 20', siringando e vortexando ogni tanto. Finita l'incubazione, la sospensione è stata centrifugata a 18000g per 30' a 4°C e il sovrnatante, contenente le proteine, è stato aliquotato in provette da 0.2 mL, congelato in azoto liquido e conservato a -80°C. La quantificazione delle proteine presenti nell'estratto cellulare è stata effettuata allo spettrofotometro (*Ultrospec 1000*, Amersham Pharmacia Biotech; Little Chalfont, UK) utilizzando il *Dye Reagent* (Bio-rad Laboratories GmbH; Munchen, Germany) per il saggio di Bradford.

7.2 Preparazione degli estratti proteici nucleari

Per ottenere l'estratto proteico nucleare sono stati ripetuti i passaggi del protocollo di estrazione proteica totale fino ad ottenere un pellet cellulare lavato e in provetta da 1,5/2 mL. A questo sono stati aggiunti 500 µl di buffer ipotonico (HEPES 10mM pH 7.9, MgCl₂ 1.5mM, KCl 10mM) con aggiunta di un cocktail di inibitori delle proteasi *Complete EDTA-free* (Roched Diagnostic, Indianapolis, IN) 2X e immediatamente centrifugato a 367g per 5' a 4°C, per eliminare i sali residui di PBS ed avvinare le cellule. Scartato nuovamente il sovrnatante, sono stati messi 200 µl di buffer ipotonico con aggiunta della soluzione *Complete* 2X e lasciato in incubazione per 10' in ghiaccio, siringando ogni tanto. Dopo aver centrifugato a 827g per 15'

a 4°C, nel pellet si hanno i nuclei isolati che sono stati trattati 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 con aggiunta del Complete 2X, e sono stati lasciati in incubazione in ghiaccio per 30', siringando e vortexando ogni tanto. Finita l'incubazione, sono stati centrifugati a 13225g per 30' a 4°C e il sovrantante, contenente le proteine, è stato aliquotato in provette da 0.2 mL, congelato in azoto liquido e conservato a -80°C.

La quantificazione delle proteine presenti nell'estratto cellulare è stata effettuata allo spettrofotometro (*Ultrospec 1000*, Amersham Pharmacia Biotech; Little Chalfont, UK) utilizzando il *Dye Reagent* (Bio-rad Laboratories GmbH; Munchen, Germany) per il saggio di Bradford.

7.3 Corsa elettroforetica, blotting e rivelazione degli estratti proteici cellulari

Gli estratti proteici 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'.

Uguali quantità di proteine sono state sottoposte a corsa elettroforetica in gel al 10% di poliacrilamide. Nel gel sono stati caricati i campioni, il marker (*Full Range Rainbow MW Marker*, Amersham Biosciences; Little Chalfont, UK) e nei pozzetti vuoti l'*SDS loading buffer* 1X. Le proteine sono stati trasferite su una membrana di nitrocellulosa (*Hybond-C Extra*, Amersham Biosciences; Little Chalfont, UK) e dopo l'elettroblotting, i filtri sono stati colorati con *soluzione di Ponceau* (Sigma-Aldrich; St.Louis, MO) per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine dal gel alla membrana.

Successivamente 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; 5% di latte scremato non

grasso in polvere) per 60' a temperatura ambiente e in agitazione. La membrana è stata poi risciacquata per due volte in TBS-T (TBS 1X, 0.1% Tween-20), sottoposta a 3 lavaggi in TBS-T, il primo di 15' e gli altri di 5', e incubata con l'anticorpo primario per 60' a temperatura ambiente nel caso di β -catenina, Actina e Lamina B oppure overnight a 4°C nel caso di p53. Lavate nuovamente le membrane in TBS-T per rimuovere l'anticorpo primario non legato, queste sono state incubate con l'anticorpo secondario coniugato all'enzima HRP (*Horseradish Peroxydase*) per 60' a temperatura ambiente. Dopo 5 lavaggi in TBS-T, il primo di 15' e gli altri di 5', la membrana è stata incubata per un minuto a temperatura ambiente e al buio con il kit *Enhanced chemoluminescence kit ("ECL-PLUS"*, Amersham Biosciences; Europe GmbH) quindi impressionata su lastra *Hyperfilm ECL* (Amersham Biosciences; Europe GmbH) in seguito opportunamente sviluppata. La lastra è stata acquisita con uno scanner e i segnali quantificati usando uno specifico software densitometrico (*Gel-Pro Analyzer*, Version 3.0; Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Gli anticorpi primari utilizzati sono: un anticorpo policlonale di coniglio anti- β -catenina (H-102, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA) diluito 1:600 in blocking solution; un anticorpo policlonale di capra anti-actina (I-19, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz CA) diluito 1:1000 in blocking solution; un anticorpo monoclonale di topo anti-p53 (1C12, Cell Signaling Technology; Danvers MA) diluito 1:2000 in blocking solution; un anticorpo policlonale di capra anti-lamina B (C-20, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz CA) diluito 1:1000 in blocking solution. Gli anticorpi secondari utilizzati sono anti-immunoglobuline di capra (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz CA), di coniglio e di topo (Amersham Biosciences; Europe GmbH) marcati con perossidasi di rafano (HRP), diluiti il primo 1:1000 e gli altri due 1:10000 in blocking solution.

8. L'immunofluorescenza (IF)

Gli esperimenti di IF sono stati condotti per valutare la localizzazione intracellulare di β -catenina nelle DAOY e nelle D283MED sottoposte a RI (a 5, 8, 16, 24 ore dalle RI) e trattamento con LiCl (dopo 24 ore). Ogni esperimento di IF è stato corredato degli appropriati controlli:

- un controllo positivo dato da una linea cellulare in cui i livelli di β -catenina nucleare sono elevati, quali le SW480 ^[134];
- un controllo wild type dato da una linea cellulare in cui il sistema WNT non è alterato, quali le RKO ^[133];
- 2 controlli per l'IF, costituiti da:
 - cellule incubate solo con l' anticorpo secondario per valutare la fluorescenza di fondo data dai legami aspecifici di questo anticorpo al campione;
 - cellule incubate nè con l' anticorpo primario nè con l' anticorpo secondario per valutare l'autofluorescenza dei campioni.

Le cellule sono state seminate su vetrini coprioggetto autoclavati inseriti in pozzetti di piastre per colture.

Dopo la rimozione del terreno di coltura e due lavaggi rapidi in PBS, le cellule sono state fissate su vetrino con una soluzione di paraformaldeide (Merck; Darmstadt, Germany) al 2% in PBS per 10' a temperatura ambiente e sono stati fatti 3 lavaggi in PBS da 3' ciascuno. I campioni sono stati poi trattati con Triton X-100 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) 0,2% in PBS per 5' per permeabilizzare le membrane citoplasmatiche e lavati 3 volte per 3' ciascuno in PBS. Successivamente i vetrini sono stati trattati con BSA (*Albumin Bovine Serum*, Minimum 98%, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) all'1% in PBS per 30' a 37°C per saturarne i siti aspecifici; quindi messi in incubazione con l' anticorpo primario policlonale di coniglio specifico per β -catenina (H-102, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA) diluito 1:100 in PBS/BSA 1% a 37° per 60'. Effettuati 6 lavaggi in PBS di 3' ciascuno, i campioni sono stati messi in incubazione al buio in camera umida con l' anticorpo secondario suino anti-

immunoglobuline di coniglio coniugato al fluorocromo FITC (Dako Cytomation; Glostrup, Denmark) diluito 1:100 in PBS/BSA 1% per 60' a 37°C; quindi la superficie del vetrino è stata lavata per 3 volte per 3' in PBS alla minore intensità di luce possibile e i vetrini sono stati controcolorati e montati con la soluzione *ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI* (Invitrogen, Oregon, USA). I campioni sono stati esaminati usando un microscopio a fluorescenza (Carl Zeiss S.p.A; Germany) con filtri appropriati.

9. L' analisi statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando il test di Dunnett di un programma per Windows (PRISM). Valori di $P < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

1. Effetti delle RI sulla crescita cellulare

Per entrambe le linee cellulari, la curva di crescita di cellule non irradiate mostra una fase di latenza iniziale, seguita da una fase in cui la concentrazione cellulare cresce in modo logaritmico (fase esponenziale), tra le 24 e 72 ore, e da una fase di crescita più lenta nelle ore successive. Nella fase esponenziale le cellule raddoppiano ad intervalli di tempo regolari: il tempo di duplicazione per le D283MED è di 37 ore, per le DAOY è di 26.5 ore (figura 6).

Le curve di crescita delle cellule irradiate a 24 ore dalla messa in coltura mostrano che la crescita delle D283MED è bloccata almeno per 72 ore successive al trattamento. Nelle DAOY la crescita risulta rallentata, anche se a 24 ore dalle RI la popolazione cellulare riprende lentamente a crescere. I tempi di duplicazione superano le 72 ore per entrambe le linee cellulari irradiate (figura 6).

2. Effetti delle RI sulla distribuzione delle popolazioni nel ciclo cellulare

Le D283MED mostrano, a 16 e 24 ore dalle RI, blocco del ciclo cellulare in fase G1 e in fase G2/M; a 48 ore dalle RI, la popolazione progredisce nel ciclo cellulare (figura 7).

Le DAOY mostrano, a 16 ore dalle RI, arresto al checkpoint G2/M, ma non a quello G1/S; a 24 ore le cellule ricominciano a ciclare normalmente (figura 7).

3. Effetti delle RI sulla vitalità cellulare

Le DAOY hanno mostrato una sopravvivenza dell'84.95%, del 95.88% e dell'90.46% rispettivamente a 24, 48 e 72 ore dalle RI, indicando un andamento altalenante della sopravvivenza cellulare all'aumentare del numero di ore dal trattamento con le RI (figura 8).

Nelle D283MED si osserva invece una diminuzione statisticamente significativa delle cellule sopravvissute a 48 e 72 ore dalle RI: la sopravvivenza è del 102.88%, 79.66% e 57.63% rispettivamente a 24, 48 e 72 ore dal trattamento (figura 8).

4. Induzione di apoptosi da parte delle RI

Nelle DAOY si osserva aumento statisticamente significativo dell'apoptosi, rispetto ai controlli non trattati, a 48 ore dal trattamento con RI. I valori del rapporto tra percentuale di apoptosi nei trattati e nei controlli sono 0.77, 1.98, 2.56, 1.37 rispettivamente a 8, 24, 48 e 72 ore dalle RI, (figura 9).

Le D283MED mostrano un aumento statisticamente significativo delle cellule in apoptosi a 48 e 72 ore dalle RI; i valori del rapporto tra percentuale di apoptosi nei trattati e nei controlli risultano 1.17, 1.15, 4.26 e 3.02 rispettivamente a 8, 24, 48 e 72 ore dalle RI (figura 9).

5. Modulazione dei livelli intracellulari di β -catenina e p53 da parte delle RI

Le DAOY mostrano un lieve aumento dei livelli totali di β -catenina in risposta alle RI che si protrae fino alle 24 ore. I livelli di p53 nelle DAOY fluttuano, senza indicare un preciso andamento (figura 10).

Nelle D283MED si rileva un aumento progressivo dei livelli totali di β -catenina nelle prime ore dopo irradiazione, che raggiunge il massimo a 3 ore dalle RI, seguito da un decremento graduale fino a un

livello basso e stazionario sovrapponibile a quello dei controlli. Le RI attivano invece p53 che aumenta nelle prime ore, raggiungendo il picco massimo a 5 ore dall'irraggiamento; nelle ore successive i livelli di p53 tornano ai valori bassi tipici dei controlli wild-type (figura 11). E' stato inoltre valutato se le RI facessero aumentare i livelli di β -catenina nucleare e quindi verosimilmente attivassero il sistema WNT: si osserva un aumento dei livelli nucleari di β -catenina nelle DAOY che mostra un picco a 5 ore dalle RI (figura 12); anche nelle D283MED si osserva aumento di β -catenina nucleare, con picchi a 5 e 16 ore dalle RI (figura 13).

6. Effetti delle RI sulla localizzazione di β -catenina

Dagli esperimenti di immunofluorescenza si osserva che nelle DAOY non irradiate β -catenina è regolarmente distribuita lungo la membrana cellulare con alcuni accumuli nella regione perinucleare; non si osserva positività nucleare.^[138] Nelle DAOY irradiate si osserva invece una positività diffusa per β -catenina nel citoplasma e gruppi di cellule presentano intensa positività per β -catenina nel nucleo dopo 5/8 e 24 ore dalle RI; dopo 16 ore dalle RI invece non si osserva alcuna positività per β -catenina nucleare (figura 14).

Le D283MED non irradiate mostrano positività per β -catenina solo a livello della membrana plasmatica in particolare nei punti di contatto tra cellula e cellula.^[138] In seguito a RI non si osserva alcuna variazione nella localizzazione di β -catenina, probabilmente a causa dei bassi livelli iniziali di espressione della proteina nonché della peculiare morfologia cellulare.^[138]

Le RKO non irradiate presentano segnale fluorescente molto debole e diffuso e sono state osservate come controllo di sistema WNT wild type; le SW480 non irradiate presentano positività nucleare per β -catenina molto intensa ed evidente e sono state osservate come controllo di sistema WNT alterato e localizzazione nucleare di β -catenina (figura 14).

7. Modulazione dei livelli intracellulari di β -catenina da parte del LiCl

Il trattamento con LiCl non determina alcun aumento dei livelli di β -catenina totale né nelle DAOY né nelle D283MED (figura 15); quello che si osserva è però un aumento dei livelli di proteina nel nucleo in entrambe le linee cellulari dopo 24 ore di trattamento (figura 16).

8. Effetti del LiCl sulla localizzazione di β -catenina

Dopo 24 ore di trattamento con LiCl nella linea DAOY si osserva chiaramente, anche se in una relativamente bassa percentuale di cellule, traslocazione di β -catenina dalla membrana plasmatica e dal citoplasma al nucleo (figura 17). Per gli stessi motivi esposti sopra non siamo in grado di apprezzare lo stesso fenomeno nella linea D283MED seppure il WB degli estratti nucleari ci mostri aumento dei livelli di proteina anche in queste cellule.

9. Effetti delle LiCl sulla crescita cellulare

Mentre nelle D283MED quello che osserviamo è un certo rallentamento della crescita cellulare con un tempo di duplicazione che passa da 37 ore a 55 ore, nelle DAOY l'effetto è quello di un brusco arresto della crescita e di una progressiva e cospicua riduzione del numero di cellule vive col prolungarsi del trattamento (figura 18).

10. Effetti del LiCl sul ciclo cellulare

Nelle DAOY osserviamo che un'elevata frazione di cellule è in fase S del ciclo cellulare a tutti i tempi di trattamento con LiCl considerati. Il LiCl e il conseguente aumento di β -catenina nucleare non sembrano pertanto attivare i checkpoint cellulari. Anche nelle D283MED non si

osservano sostanziali alterazioni del ciclo cellulare a parte un temporaneo arresto in fase S alle 24 ore dalla somministrazione di LiCl, non più osservabile alle 48 ore (figura 19).

11. Effetti delle LiCl sulla vitalità cellulare

Nelle DAOY si osserva una progressiva e significativa diminuzione della vitalità cellulare con l'aumentare delle ore di trattamento con LiCl (a partire da 24 ore fino a 96 di somministrazione) mentre nelle D283MED non si osserva alcuna riduzione della vitalità cellulare (figura 20).

10. Effetti del LiCl sull' apoptosi

Non si osserva aumento significativo dei livelli di apoptosi in nessuna delle due linee di MB in seguito a trattamento con LiCl.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Sebbene il MB sia considerato un tumore complessivamente radiosensibile una certa percentuale di pazienti è incurabile, la risposta alla radioterapia è difficile da prevedere e la terapia stessa è gravata da importanti effetti collaterali a lungo termine. Gli obiettivi sono pertanto sia quello di aumentare l'efficacia terapeutica del trattamento sia di ridurre il più possibile le dosi di RI, adeguandole al singolo paziente, senza inficiare l'efficacia del trattamento. [7] Il chiarimento dei meccanismi molecolari che intervengono nella risposta alle RI di cellule di MB darà un notevole impulso al raggiungimento di tali obiettivi. Si tratta di un' ardua sfida poiché questa neoplasia è estremamente eterogenea e verosimilmente le diverse varianti istopatologiche hanno istogenesi, patogenesi e risposta ai trattamenti diverse. [2, 9] Per raggiungere i traguardi suddetti è quindi importante anche approfondire le conoscenze sulla biologia del MB . Un passo fondamentale è quello di perfezionare la stratificazione del rischio per pazienti con MB che attualmente si basa esclusivamente su parametri clinici. [7]. E' stata recentemente attribuita alla presenza di β -catenina nucleare il ruolo di fattore prognostico positivo [26], ma rimane da definire se questa sia una caratteristica legata ad un fenotipo meno aggressivo o se conferisca maggiore suscettibilità ai trattamenti. Ad oggi non si conosce se β -catenina abbia una funzione nella risposta cellulare alle RI. E' di grande interesse, quindi, capire quale meccanismo molecolare porti β -catenina nucleare ad espletare il suo ruolo prognostico positivo nel MB.

Il nostro principale scopo è stato quello di valutare su linee cellulari di MB la risposta alle RI, di studiare se in questa risposta potessero essere coinvolte la β -catenina e le sue relazioni con la proteina p53. Abbiamo scelto come sistema *in vitro* una linea di MB con p53 mutata (DAOY) e una con p53 wild type (D283MED). Nelle 72 ore successive al trattamento con raggi γ , non si osserva induzione

significativa di mortalità nelle DAOY, mentre per le D283MED si osserva una riduzione statisticamente significativa della vitalità cellulare a 48 e 72 ore dalle RI. Per quanto riguarda gli effetti sulla distribuzione delle popolazioni nel ciclo cellulare, abbiamo evidenziato che in entrambe le linee cellulari viene attivato il checkpoint G2/M, mentre solo nelle D283MED, in cui p53 è wild type, si ha arresto anche in G1/S. Il blocco del ciclo, necessario per i tentativi di riparo del danno genotossico, è più prolungato nelle D283MED rispetto alle DAOY ed infatti queste ultime già 24 ore dopo l'irradiazione rientrano in ciclo. L'andamento della crescita cellulare concorda con i suddetti risultati in quanto mentre mostra un arresto della crescita nelle D283MED, almeno per le 72 ore successive al trattamento, nelle DAOY mostra un sensibile rallentamento, ma non un arresto, ed infatti queste cellule dopo 24 ore dalle RI ricominciano a proliferare. Quanto osservato riflette il diverso stato funzionale di p53 nelle due linee ed è verosimilmente legato anche ad un diverso assetto molecolare globale che conferisce alla linea DAOY, più indifferenziata ^[138], una maggiore spinta proliferativa ed una minore responsività ai fattori estrinseci che regolano la crescita cellulare.

Anche se i meccanismi molecolari di soppressione della crescita tumorale attivati dalle RI sono diversi e anche se appare ormai evidente quanto sia improbabile che una sola modalità determini l'esito della terapia, l'apoptosi è considerata una delle principali modalità di risposta al danno genotossico e il successo della terapia antineoplastica sembra dipendere, in buona parte, dalla capacità delle cellule tumorali di rispondere in tal senso. Alcuni dati evidenziano inoltre che linee cellulari di medulloblastoma, tra cui le DAOY e le D283MED oggetto del nostro studio, muoiono per apoptosi in seguito a trattamento con RI ^[125]. Per queste ragioni abbiamo ritenuto importante valutare non solo la mortalità complessiva indotta dalle RI, ma anche il contributo specifico della morte cellulare per apoptosi. Le DAOY sono le prime a rispondere alle RI andando in apoptosi alle 24 ore, mentre le D283MED lo fanno solo successivamente,

probabilmente perché sono bloccate ai checkpoint cellulari; a 48 e a 72 ore, però, il fenomeno è più massiccio nelle D283MED.

Fin qui i nostri risultati confermano i dati già presenti in letteratura e aggiungono informazioni complementari relative agli effetti delle RI sul ciclo, sulla crescita e sulla mortalità cellulare, che nel loro complesso descrivono la risposta delle due linee di MB, scelte come modelli *in vitro*, al trattamento radioterapico. In particolare i nostri dati confermano che la presenza di p53 wild-type è indice di maggior risposta alle RI sia in termini di mortalità generale sia in termini di apoptosi; è riportato infatti in letteratura che linee cellulari di MB con p53 wild-type hanno un indice apoptotico maggiore rispetto a linee con p53 mutata.^[125]

Quello che però ci premeva maggiormente era capire quale fosse l'effetto dei raggi γ a livello molecolare e se la risposta coinvolgesse la proteina β -catenina e il suo crosstalk con p53. Studi di espressione genica, tramite WB, e di localizzazione, tramite IF, ci rivelano che le RI hanno l'effetto di indurre un aumento dei livelli di β -catenina sia totale che nucleare nelle nostre linee di MB associato verosimilmente all'attivazione del sistema WNT. Nelle DAOY l'aumento dei livelli totali di β -catenina è modesto, probabilmente a causa dei livelli di base già elevati^[138], ma protratto nel tempo; nelle D283MED, in cui i livelli basali sono bassi^[138], l'aumento è più consistente, ma limitato nel tempo. L'andamento dei livelli di espressione di β -catenina e p53, nelle D283MED, sembra confermare l'esistenza di un crosstalk tra le due proteine: l'aumento di β -catenina, probabilmente indotto dalle RI, precede il picco di espressione di p53 in seguito al quale sia i livelli di β -catenina che di p53 tornano bassi e stazionari. E' plausibile ipotizzare che l'aumento e la stabilizzazione dei livelli totali di β -catenina nelle DAOY indotti dalle RI siano favoriti dalla mancanza di alcuni meccanismi che li contrastano, come i processi di degradazione di β -catenina p53-mediati. Nelle D283MED dove invece p53 viene attivata dalle RI l'accumulo di β -catenina nella cellula è transitorio. In questa linea, i bassi livelli iniziali di β -catenina nonché la peculiare

morfologia cellulare non ci permettono di apprezzare le variazioni di localizzazione della proteina, indotte dalle RI. Nelle DAOY, invece, il fenomeno della traslocazione di β -catenina al nucleo, probabilmente a causa dei livelli di espressione già elevati nelle cellule non irradiate [138] e dell'ulteriore aumento indotto dal trattamento radioterapico, è molto evidente, anche se solo in una bassa percentuale di cellule. L'effetto dei raggi γ sul sistema WNT potrebbe infatti dipendere dalla fase del ciclo cellulare in cui si trova la cellula quando subisce il danno genotossico. Resta da verificare, per entrambe le linee cellulari oggetto del nostro studio, se la traslocazione nucleare sia effettivamente associata ad attivazione del sistema WNT ossia a trascrizione dei suoi geni target.

I dati in nostro possesso sembrano indicare che nella risposta alle RI di cellule di MB sia in qualche modo coinvolta anche β -catenina e mostrano una correlazione tra gli andamenti di β -catenina stessa e di p53. Le RI sembrano in grado di deregolare β -catenina e ciò rappresenterebbe uno stimolo all'attivazione di p53 che va ad aggiungersi allo stimolo rappresentato dal danno al DNA radio-indotto. [44] L'attivazione di p53, d'altra parte, induce la degradazione proteolitica di β -catenina [51-53]; in assenza di p53 funzionale, β -catenina è libera di esercitare i suoi effetti a valle. Ma quali sono questi effetti in cellule di MB? Sta emergendo dalla letteratura come β -catenina abbia funzioni antitetiche e tessuto/tumore specifiche, essendo in grado di promuovere proliferazione e progressione tumorale in determinati contesti [26,42,43,126,127-130] mentre in altri di indurre apoptosi o arresto della crescita simile a senescenza, con modalità sia p53-dipendente che p53-indipendente. [26,49,50,54-58,60,61,67,124] Studi *in vitro* hanno dimostrato come in alcuni tipi cellulari e situazioni specifiche β -catenina sia in grado di indurre apoptosi, anche in presenza di p53 alterata. [56,58,61]. Dai dati ottenuti nei nostri modelli sperimentali possiamo ipotizzare che le due modalità apoptotiche, mediate l'una da p53 e l'altra da β -catenina, collaborino tra di loro oppure abbiano funzioni apoptotiche ridondanti oppure che

il meccanismo p53-indipendente supplisca, in parte, alla mancanza di funzionalità di quello principale p53-mediato. E' stato osservato, infatti, che nelle DAOY si ha induzione di apoptosi nonostante p53 non sia funzionante, ma tale induzione è più cospicua nelle D283MED dove entrambi i sistemi sono attivati. L'attivazione del sistema WNT potrebbe quindi avere un effetto pro-apoptotico nel MB.

Con i dati finora discussi possiamo ipotizzare che l'aumento di β -catenina indotto dalle RI e l'apoptosi p53-dipendente e/o p53-indipendente siano fenomeni tra loro collegati e consequenziali ma non siamo ancora in grado di dimostrarlo inequivocabilmente. Nel tentativo di verificare, almeno in parte, la nostra ipotesi abbiamo indotto l'aumento di β -catenina nelle nostre linee cellulari trattandole con cloruro di litio (LiCl) un inibitore farmacologico di GSK-3 β in grado di mimare l'attivazione del sistema WNT; esso infatti porta ad accumulo di proteina non fosforilata e quindi non degradabile. [60,61,135,136] Abbiamo verificato, sia in WB sia in IF, che questo composto portasse effettivamente ad accumulo di β -catenina nel nucleo delle nostre cellule. L'aumento di β -catenina non è associato ad alterazioni palesi del ciclo cellulare, ma la crescita di entrambe le popolazioni ne risente poiché una linea (D283MED) rallenta mentre l'altra subisce arresto progressivo della crescita (DAOY). Quest'ultima poi mostra anche un aumento significativo della mortalità cellulare in seguito a trattamento con LiCl verosimilmente attribuibile all'aumento dei livelli di β -catenina nucleare osservati. A questa mortalità non sembra però contribuire l'apoptosi che non è indotta in maniera significativa dal sale di litio. Oltre all'apoptosi comunque esistono diversi meccanismi molecolari di soppressione della crescita tumorale tra cui l'induzione della senescenza, del differenziamento terminale e della catastrofe mitotica e non possiamo escludere che questi fenomeni avvengano nelle nostre linee cellulari. Complessivamente possiamo ipotizzare, da questi dati preliminari, che la β -catenina nucleare determini un fenotipo tumorale meno aggressivo.

Sono indubbiamente necessari ulteriori esperimenti per verificare le nostre ipotesi e per dare una spiegazione molecolare al ruolo prognostico positivo della β -catenina nucleare nel MB e occorre innanzi tutto verificare se la presenza di β -catenina nel nucleo si associ anche ad aumento della radiosensibilità. Siamo quindi motivati ad approfondire lo studio del ruolo di β -catenina nella risposta al trattamento con RI del MB umano e a capire se in un futuro si possa sfruttare l'attivazione del sistema WNT a scopo terapeutico, tenendo conto che esistono molecole già in uso o in sperimentazione per altre patologie, come i sali di litio e gli inibitori delle istone deacetilasi, in grado di indurre tale effetto. ^[68,135]

BIBLIOGRAFIA

- [1] Eberhart CG, Kepner JL, Goldthwaite PT, Kun LE, Duffner PK, Friedman HS, Strother DR, Burger PC. *Histopatologic 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] Taylor MD, Mainprize TG, Rutka JT. *Molecular insight into medulloblastoma and central nervous system primitive neuroectodermal tumor biology from hereditary syndromes: a review*. Neurosurgery; 47, 888-901, 2000.
- [5] Kratz JE, Stearns D, Huso DL, Slunt HH, Price DL, Borchelt DR, Eberhart CG. *Expression of stabilized β -catenin in differentiated neurons of transgenic mice does not result in tumor formation*. BMC Cancer; 2, 33; 2002.
- [6] Jozwiak J, Grajkowska W, Wlodarski P. *Pathogenesis of medulloblastoma and current treatment outlook*. Med Res Rev; 1-17, 2006.
- [7] Gilbertson RJ. *Medulloblastoma: signaling a change in treatment*. Lancet Oncol; 5, 209-218, 2004.
- [8] Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush JA, Berk T, Cohen Z, Tetu B, Burger PC, Wood PA, Taqi F, Booker SV, Petersen GM, Offerhaus GJA, Tersmette AC, Giardiello FM, Vogelstein B, Kenneth W. Kinzler KW. *The molecular basis of Turcot's syndrome*. N Engl J Med; 332, 839-847, 1995.
- [9] Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturia 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] Giangaspero F, Bigner SH, Kleiheus P, Pietsch T, Trojanowski JQ. *Medulloblastoma*. In *WHO classification of tumours*. Pathology & Genetics. Tumours of the nervous system. Eds P. Kleiheus and W.K. Cavenee, IARC press, Lyon, 2000.
- [11] Chang CH, Housepian EM, Herbert Cjr. *An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas*. Radiology; 93, 1351-69, 1969.
- [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] 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.
- [14] Haslam RH, Lamborn KR, Becker LE, Israel MA. *Tumor cell apoptosis present at diagnosis may predict treatment outcome for patients with medulloblastoma*. J Pediatr Hematol Oncol; 20, 520-527, 1998.
- [15] Korshunov A, Savostikova M, Ozerov S. *Immunohistochemical markers for prognosis of average-risk pediatric medulloblastoma. The effect of apoptotic index, TrkC, and c-myc expression*. J Neurooncol; 58, 271-279, 2002.
- [16] Grotzer MA, Janss AJ, Fung KM, Sutton LN, Zhao H, Trojanowski JQ, Rorke LB, Phillips PC. *Abundance of apoptotic neoplastic cells in diagnostic biopsy samples is not a prognostic factor in childhood primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. J Pediatr Hematol Oncol; 23, 25-29, 2001.
- [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] Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer Res; 513-516, 2001.*
- [22] Woodburn RT, Azzarelli B, Montebello JF, Goss IE. Intense p53 staining is a valuable prognostic indicator for poor prognosis in medulloblastoma/central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *J. Neurooncol; 52, 57-62, 2001.*
- [23] Giordana MT, Duò D, Gasverde S, Trevisan E, Boghi A, Morra I, Pradotto L, Mauro A, Chiò A. *MDM2 overexpression is associated with short survival in adults with medulloblastoma. Neuro-oncol 2002.*
- [24] Ray A, Ho M, Ma J, Parkes RK, Mainprize TG, Ueda S, McLaughlin J, Bouffet E, Rutka J, Hawkins CE. *A clinicobiological model predicting survival in medulloblastoma. Clin Cancer Res; 10, 7613-7620, 2004.*
- [25] 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.*
- [26] Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, Lusher ME, Weston CL, Taylor RE, Pearson AD, Clifford SC, United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *β -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.
- [27] Marino S. *Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. Trends in Mol Med*; 11, 17-22, 2005.
- [28] Miller JR. *The Wnts. Genome Biol*; 3,1-15, 2001.
- [29] Cadigan KM, Liu YI. *Wnt signaling: complexity at the surface. J. Cell Sci*; 119, 395-402, 2006.
- [30] Logan CY, Nusse R. *The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu. Rev. Cell Dev. Biol*; 20,781-810, 2004.
- [31] Nusse R. *An ancient cluster of Wnt paralogues. Trends Genet*; 17, 443, 2001.
- [32] Dubois L, Lecourtois M, Alexandre C, Hirst E, Vicent JP. *Regulated endocytic routing modulates wingless signaling in Drosophila embryo. Cell*; 105, 613-624, 2001.
- [33] Cadigan KM, Nusse R. *Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev*; 11, 3286-3305, 1997.
- [34] Bejsovec A. *Wnt signaling: an embarrassment of receptors. Curr Biol*; 10, R919-R922, 2000.
- [35] Pandur P, Kuhl M. *An arrow for wingless to take-off. Bioessays*; 23,;207-210, 2001.
- [36] Nelson JW, Nusse R. *Convergence of Wnt, β -catenin and Cadherin Pathways. Science*; 303, 1483-1487, 2004.
- [37] Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. *E-cadherin and APC compete for the interaction with β -catenin and cytoskeleton. J Cell Biol*; 127, 2061-2069;1994.
- [38] Gumbiner BM. *Regulation of Cadherin adhesive activity. J Cell Biol*; 148, 399-404, 2000.
- [39] Stadel R, Hoffmans R, Basler K. *Transcription under the control of nuclear Arm/ β -catenin. Curr Biol*; 16, R378-R385, 2006.
- [40] Yamaguchi TP. *Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. Curr Biol*; 11, R713-R724, 2001.
- [41] Brembeck FH, Rosàrio M, Birchmeier W. *Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. Curr. Opin. Genet. Dev*;

- 16,51-59, 2006.
- [42] Koch A, Waha A, Tonn JC. *Somatic mutation of Wnt/Wingless pathway components in primitive neuroectodermal tumours*. Int J Cancer; 93, 445-449, 2001.
- [43] Morin PJ. *β -catenin signaling and cancer*. Bioessay; 21, 1021-1030, 1999.
- [44] Oren M. *Decision making by p53: life, death and cancer*. Cell Death and Differentiation; 10, 431-442, 2003.
- [45] Ginsberg D, Mehta F, Yaniv M, Oren M. *Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters*. Proc Natl Acad Sci USA; 88:, 9979-9983, 1991.
- [46] Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. *Downregulation of bcl-2 by p 53 in breast cancer cells*. Cancer Res; 54, 2095-2097, 1994.
- [47] Miyashita T, Harigari M, Hanada M, Reed JC. *Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene*. Cancer Res; 54, 3131-3135, 1994.
- [48] Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR. *p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release*. J Biol Chem; 275, 7337-7342, 2000.
- [49] Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I, Shtutman M, Leal JF, Zhurinsky J, Geiger B, Oren M. *Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53*. EMBO J; 18, 3054-3063, 1999.
- [50] Damalas A., Kahan S., Shtutman M., Ben-Ze'ev A, Oren M. *Deregulated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation*. EMBO J; 20, 4912-4922, 2001.
- [51] Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ; Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N. *Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein*. Mol Cell; 7, 927-936, 2001.
- [52] Matsuzawa SI, Reed JC. *Siah-1, SIP and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses*. Mol.

- Cell; 7, 915-926, 2001.
- [53] Sadot E, Geiger B, Oren M, Ben-Ze'ev A. *Dowregulation of beta-catenin by activated p53*. Mol. Cell Biol; 21, 6768-6781, 2001.
- [54] Wong SCC, Chan ATC, Chan JKC, Lo YMD. *Nuclear β -catenin and Ki-67 expression in choriocarcinoma and its pre-malignant form*. J. Clin. Pathol; 59,387-392, 2006
- [55] Tell S, Yi H, Jockovich ME, Murray TG, Hackam AS. *The WNT signaling pathway has tumor suppressor properties in retinoblastoma*. Biochem Biophys Res Commun; 349, 261-269, 2006.
- [56] Jullig M, Zhang WV, Ferreira A, Stott N. *MG-132 induced apoptosis is associated with p53-independent induction of pro-apoptotic Noxa and transcriptional activity of β -catenin*. Apoptosis; 11, 627-641, 2006.
- [57] Van Gijn ME, Snel F, Cleutjens PM, Smits JFM, Blankesteyn WM. *Overexpression of components of the Frizzled-Dishevelled cascade results in apoptotic cell death, mediated by β -catenin*. Exp Cell Res; 265, 46-53, 2001.
- [58] Kim K, Pang KM, Evans M, Hay ED. *Overexpression of β -catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators*. Mol Biol Cell; 11, 3509-3523, 2000.
- [59] Huang M, Wang Y, Sun D, Zhu H, Yin Y, Zhang W, Yang S, Quan I, Bai J, Wang S, Chen Q, Li S, Xu N. *Identification of genes regulated by Wnt/ β -catenin pathway and involved in apoptosis via microarray analysis*. BMC Cancer; 6, 221, 2006.
- [60] Ghosh JC, Altieri DC. *Activation of p53-dependent apoptosis by acute ablation of glycogen synthase kinase-3 β in colorectal cancer cells*. Clin Cancer Res; 11, 4580-4588, 2005.
- [61] Olmeda D, Castel S, Vilaro S, Cano A. *β -catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis* Mol Biol Cell; 14, 2844-2860, 2003.
- [62] Hoeflich KP, Luo j, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and*

- NF-kappaB activation*. Nature; 406, 86-90, 2000.
- [63] Gregory MA., Qi Y, Hann SR. *The ARF tumor suppressor: keeping myc on a leash*. Cell cycle; 4, 249-252, 2005.
- [64] . Ying QI, Mark AG, Zhaoliang LI, Brousal JP, West K, Hann SH. *P19^{ARF} directly and differentially controls the function of c-myc independently of p53*. Nature; 431, 712-717, 2004.
- [65] Suzuki H, Kurita M, Mizumoto K, Nishimoto I, Ogata E, Matsuoka M. *P19^{ARF} -induced p53-independent apoptosis largely occurs through BAX*. Biochem Biophys Res Commun; 312, 1273-1277, 2003.
- [66] Paliwal S, Pande S, Kovi RC, Sharpless NE, Bardeesy N, Grossman SR. *Targeting of C-terminal Binding Protein (CtBP) by ARF results in p53-Independent apoptosis*. Mol. Cell. Biol; 26, 2360-2372, 2006.
- [67] Su F, Overholtzer M, Besser D, Levine AJ. *WISP-1 attenuates p53-mediated apoptosis in response to DNA damage through activation of the Akt kinase*. Genes Dev; 16, 46-57, 2002.
- [68] Abramova MV, Pospelova TV, Nikulenka FP, Hollander CM, Fornace AJ Jr, Pospelov VA. *G1/S arrest induced by Histone Deacetylase inhibitor sodium-butyrate in E1A+Ras- transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of β -catenin*. J Biol Chem; 281, :21040-21051, 2006.
- [69] Baek SH, Kioussi C, Briata P, Wang D, Nguyen HD, Ohgi KA, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rose DW, Rosenfeld MG. *Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway*. Proc Natl Acad Sci USA; 100, 3245-3250, 2003.
- [70] Kaplan DD, Meigs TE, Kelly P, Casey P. *Identification of a role for β -catenin in the establishment of a bipolar mitotic spindle*. J Biol Chem; 279, 10829-10832, 2004.
- [71] Belka C. *The fate of irradiated tumor cells*. Oncogene; 25, 969-971, 2006.
- [72] Gudkov AV, Komarova EA. *The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy*. Nat Rev Cancer ; 3, 117-129, 2003.
- [73] Willers H, Dahm-Daphi J, Powell SN. *Repair of radiation damage to DNA*. Br J Cancer; 9, 1297-1301, 2004.

- [74] Zhou BB, Elledge SJ. *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature; 408, 433-439, 2000.
- [75] 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.
- [76] Niida H, Nakanishi M. *DNA damage checkpoints in mammals*. Mutagenesis; 21,3-9, 2006.
- [77] Mochan TA, Venere M, DiTullio RAjr, Halazonetis TD. *53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage*. DNA Repair; 3, 945-952, 2004.
- [78] Stucki M, Jackson SP. *MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes*. DNA Repair; 3, 953-957, 2004.
- [79] Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J. *Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage*. Nat Cell Biol; 5, 255-260, 2003.
- [80] Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Falk J; Bekker-Jensen S, Goldberg M, Lerenthal Y, Jackson SP, Bartek J, Lukas J. *Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention*. EMBO J; 23, 2674-2683, 2004.
- [81] 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.
- [82] O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA. *A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome*. Nat Genet; 33, 497-501, 2003.
- [83] Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. *ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling*. Science; 294, 1713-1716, 2001.
- [84] Unsal-Kacmaz K, Sancar A. *Quaternary structure of ATR and effects of ATRIP and replication protein A on its DNA binding and kinase activities*. Mol Cell Biol; 24, 1292-1300, 2004.
- [85] Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Hiroyasu

- Nagahama H, Tsukiyama T, Ikeda K, Nakayama K, Nakanishi M, Nakayama K. *Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1 (-/-) mice*. *Genes Dev*; 14, 1439-1447, 2000.
- [86] Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ. *Chk1 is an essential kinase that is regulated by ATR and required for the G2/M DNA damage checkpoint*. *Genes Dev*; 14, 1448-1459, 2000.
- [87] Zou L, Cortez D, Elledge SJ. *Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin*. *Genes Dev*; 16, 198-208, 2002.
- [88] Weiss RS, Matsuoka S, Elledge SJ, Leder P. *Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway*. *Curr Biol*, 12, 73-77, 2002.
- [89] Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE, Haber DA. *Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome*. *Science*; 286, 2528-2531, 1999.
- [90] Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, Saito S, Anderson CW, Appella E, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Sawa H, Ikeda K, Motoyama N. *Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription*. *EMBO J*; 21, 5195-5205, 2002.
- [91] Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW. *DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2*. *Science*; 287, 1824-1827, 2000.
- [92] Appella E, Anderson CW. *Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses*. *Eur J Biochem*; 268; 2764-2772, 2001.
- [93] Perry ME. *MDM2 in response to radiation*. *Mol Cancer Res*; 2, 9-19, 2004.
- [94] Liang SH, Clarke MF. *Regulation of p 53 localization*. *Eur J Biochem*; 268, 2779-2783, 2001.

- [95] 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.
- [96] Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. *Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control*. Cell; 82, 675–684, 1995.
- [97] Arata Y, Fujita M, Ohtani K, Kijima S, Kato JY. *Cdk2-dependent and independent pathways in E2F-mediated S phase induction*. J. Biol. Chem; 275, 6337-6345, 2000.
- [98] Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. *The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis*. Nature; 410, 842–847, 2001.
- [99] Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuasen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J. *Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage*. Science; 288, 1425–1429, 2000.
- [100] Agami R, Bernards R. *Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage*. Cell; 102, 55–66, 2000.
- [101] Chen MS, Hurov J, White LS, Woodford-Thomas T, Piwnicka-Worms H. *Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase*. Mol Cell Biol; 21, 3853–3861, 2001.
- [102] Lincoln AJ, Wickramasinghe D, Stein P, Schultz RM, Palko ME, De Miguel MP, Tessarollo L, Donovan PJ. *Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation*. Nat Genet; 30, 446–449, 2002.
- [103] Offer H., Erez N, Zurer I, Tang X, Milyavsky M, Goldfinger N, Rotter V. *The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA*. Carcinogenesis; 23, 1025-1032, 2002.
- [104] Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. *Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents*. J

- Clin Invest; 104, 236-269, 1999.
- [105] Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. *Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents.* Cancer Res; 56, 892-898, 1996.
- [106] Palacios C, Gutierrez del Arroyo A, Silva A, Collins MK. *The role of p53 in death of IL-3-dependent cells in response to cytotoxic drugs.* Oncogene; 19, 3556-3559, 2000.
- [107] Offer H, Zurer I, Banfalvi G, Reha'k M, Falcovitz A, Milyavsky M, Goldfinger N, Rotter V. *p53 modulates base excision repair activity in a cell-specific manner after genotoxic stress.* Cancer Res; 61, 88-96, 2001.
- [108] Pardo FS, Su M, Borek C, Preffer F, Dombkowski D, Gerweck L, Schmidt EV. *Transfection of rat embryo cells with mutant p53 increases the intrinsic radiation resistance.* Radiat Res; 140, 180-185, 1994.
- [109] Wang L, Cui Y, Lord BI, Roberts SA, Potten CS, Hendry JH, Scott D. *Gamma-ray-induced cell killing and chromosome abnormalities in the bone marrow of p53 deficient mice.* Radiat Res; 146:, 59-266, 1996.
- [110] DiBiase SJ, Guan J, Curran WJjr, Iliakis G. *Repair of DNA double-strand breaks and radiosensitivity to killing in an isogenic group of p53 mutant cell lines.* Int J Radiat Oncol Biol Phys; 45, 743-751, 1999.
- [111] Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y, Kandel ES, Lausch E, Christov K, Roninson IB. *A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents.* Cancer Res; 59, 3761-3767, 1999.
- [112] Chang BD, Broude EV, Fang J, Kalinichenko TV, Abdryashitov R, Poole JC, Roninson IB. *p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells.* Oncogene; 19, 2165-2170, 2000.
- [113] Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ, Lee SW, Aaronson

- SA. *Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence*. EMBO J; 21, 2180-2188, 2002.
- [114] Kemp CJ, Sun S, Gurley KE. *p53 induction and apoptosis in response to radio- and chemotherapy in vivo is tumor-type-dependent*. Cancer Res; 61, 327-332, 2001.
- [115] Brown JM, Wouters BG. *Apoptosis: mediator or mode of cell killing by anticancer agents?* Drug Resist. Update; 4, 135-136, 2001.
- [116] Nieder C, Petersen S, Petersen C, Thames HD. *The challenge of p53 as a prognostic and predictive factor in gliomas*. Cancer Treat Rev; 26, 67-73, 2000.
- [117] Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. EMBO J; 17, 2215-2223, 1998.
- [118] Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. *Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome*. Nature Cell Biol; 2, 469-475, 2000.
- [119] Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. *Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy*. Cell; 108, 153-164, 2002.
- [120] Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T. *p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo*. Science; 266, 807-810, 1994.
- [121] Roninson IB, Broude EV, Chang BD. *If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells*. Drug Resist Update; 4, 303-313, 2001.
- [122] Ianzini F, Mackey MA. *Delayed DNA damage associated with mitotic catastrophe following X-irradiation of HeLa S3 cells*. Mutagenesis; 13, 337-344, 1998.
- [123] Dini L, Coppola S, Ruzittu MT, Ghibelli L. *Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation*. Exp Cell Res; 223, 340-347, 1996.
- [124] Orford K, Caroline C, Byers SW. *Exogenous expression of β -catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis,*

- and radiation-induced cell cycle arrest.* J Cell Biol; 146, 855-867; 1999.
- [125] Dee S, Haas-Kogan DA, Israel M. *Inactivation of p53 is associated with decreased levels of radiation-induced apoptosis in medulloblastoma cell lines.* Cell Death and Differentiation; 2, 267-275, 1995.
- [126] Hirabajashi H, Itoh Y, Nakajima K, Akijama T, Masuyama N, Gotoh Y. *The Wnt/ β -catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells.* Development; 131, 2791-2801, 2004.
- [127] Dahmen RP, Koch A, Denkhaus D. *Deletions of axin1, a component of the wnt/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas.* Cancer Res; 61, 7039-7043, 2001.
- [128] Zechner D, Fujita Y, Hulsken J, Muller T, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB 3rd, Birchmeir W, Birchmeir C. *β -catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system.* Dev Biol; 258, 406-418, 2003.
- [129] Bondi J, Bukholm G, Nesland JM, Bukholm IR. *Expression of non-membranous β -catenin and γ -catenin, c-myc and cyclin D1 in relation to patient outcome in human colon adenocarcinomas.* Apms; 112, 49-56, 2004.
- [130] Nhieu JT, Renard CA, Wei Y, Cherqui D, Zefrani ES, Buendia MA. *Nuclear accumulation of mutated β -catenin in hepato-cellular carcinoma is associated with increased cell proliferation.* Am J Pathol; 155, 703-710, 1999.
- [131] Gottardo NG, Gajjar A. *Current therapy for medulloblastoma.* Curr Treat Options Neurol; 8, 319-334, 2006.
- [132] <http://www.atcc.org>
- [133] Ricciardiello L, Baglioni M, Giovannini C, Pariali M, Cenacchi G, Ripalti A, Landini MP, Sawa H, Nagashima K, Frisque RJ, Goel A, Boland CR, Tognon M, Roda E, Bazzoli F. *Induction of chromosomal instability in colonic cells by the human polyomavirus JC virus.* Cancer Res; 63, 7256-7262, 2003.
- [134] Dihlmann S, Siermann A, von Knebel Doeberitz M. *The nonsteroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate β -*

- catenin/TCF-4 signaling*. *Oncogene*; 20:, 45-653, 2001.
- [135] Rao AS, Kremenevskaja N, Resch J, Brabant G. *Lithium stimulates proliferation in cultured thyrocytes by activating Wnt/ β -catenin signalling*. *Eur J Endocrinol*. 153; 929-938, 2005.
- [136] Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein PS. *Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium*. *J Biol Chem*; 278, 33067-33077, 2003.
- [137] Nusse M, Beisker W, Hoffmann C, Tarnok A. *Flow cytometric analysis of G1- and G2/M-phase subpopulations in mammalian cell nuclei using side scatter and DNA content measurements*. *Cytometry*; 11, 813-821, 1990.
- [138] Salaroli R, Russo A, Ceccarelli C, Mina G D, Arcella A, Martinelli G N, Giangaspero F, Capranico G, Cenacchi G. *Intracellular distribution of β -catenin in human medulloblastoma cell lines with different degree of neuronal differentiation*. *Ultrastruct. Pathol*; 31, Jan 2007 (in press).

ICONOGRAFIA

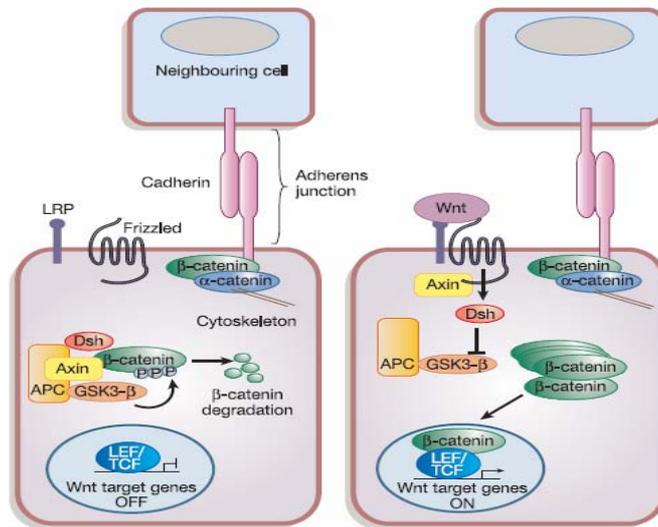


Fig. 1: Pathway Wnt/β-catenina: a sinistra sistema inattivo, in assenza della proteina Wnt, e degradazione di β-catenina; a destra sistema attivato dalla presenza della proteina Wnt, e traslocazione di β-catenina al nucleo (riprodotta da *Reya T et al., 2005*).

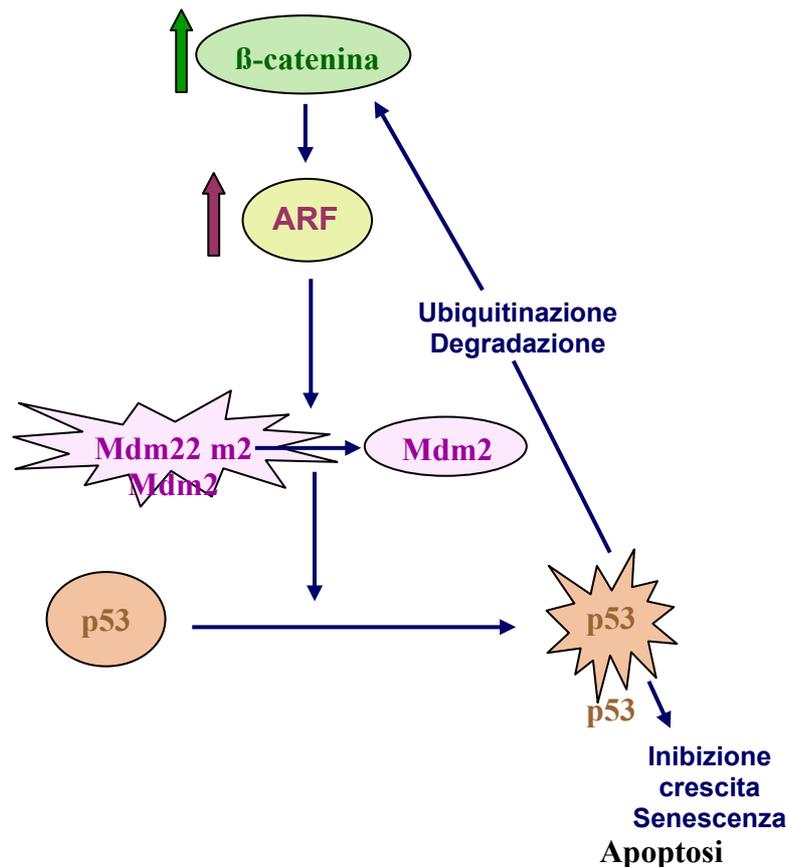
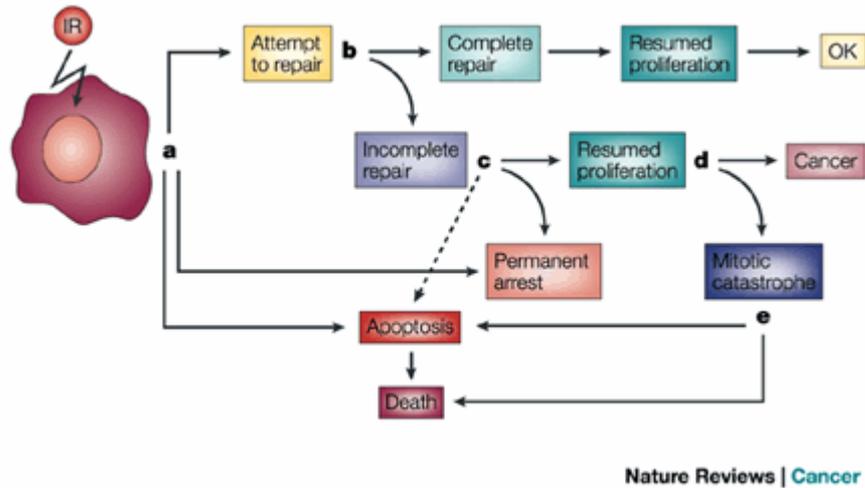


Fig. 2: Cross-talk tra β-catenina e p53. L'aumento di β-catenina comporta aumento dei livelli di ARF e quest'ultima lega Mdm2, bloccandone la funzione e contrastando così l'inibizione di p53. P53 attivata induce la degradazione proteolitica di β-catenina e promuove la soppressione tumorale, inducendo blocco del ciclo cellulare, senescenza e apoptosi.



Nature Reviews | Cancer

Fig.3 Destino della cellula in seguito a RI (a) la cellula colpita da RI può andare in apoptosi o arresto temporaneo o permanente della crescita nel tentativo di riparare il danno genotossico. **b.** la cellula che riesce a riparare il danno completamente riprende le sue normali funzioni. Se invece il danno è irreparabile (c) la cellula può arrestarsi definitivamente o riprendere a proliferare. Se il danno irreparabile non è letale, la cellula che prolifera ha acquisito mutazioni: un rischio aumentato di portare al cancro (d). Se il danno è letale la cellula va in catastrofe mitotica seguita da necrosi o apoptosi (e). (riprodotta da Gudkov AV et al., 2003).

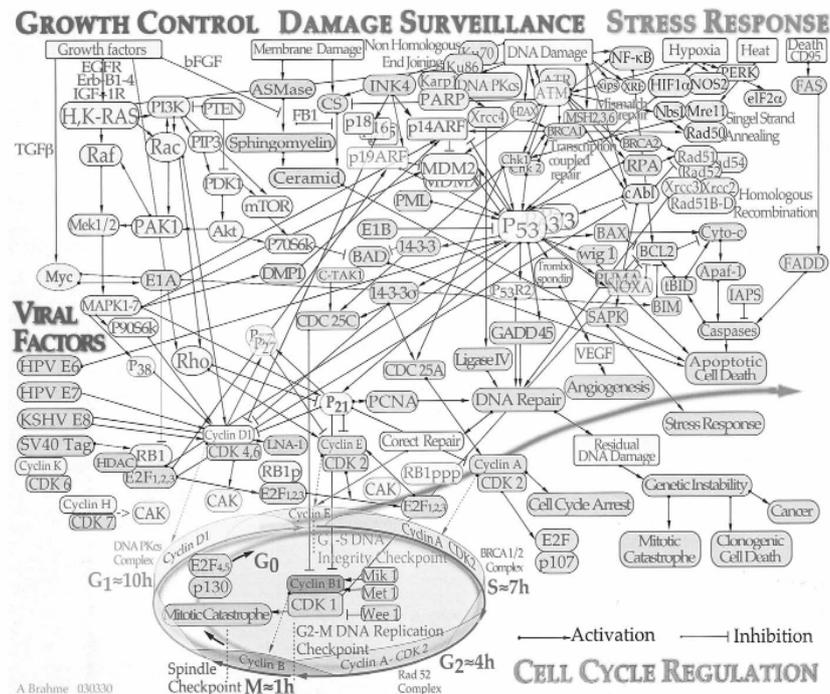


Fig.4 Meccanismi di soppressione della crescita tumorale. Le RI attivano diversi meccanismi molecolari di soppressione della crescita tumorale: arresto del ciclo cellulare, induzione della senescenza, dell'apoptosi, del differenziamento terminale e della catastrofe mitotica. Molti se non tutti i pathway molecolari che mediano questi fenomeni sono strettamente interconnessi (riprodotta da Brahma A et al., 2003).

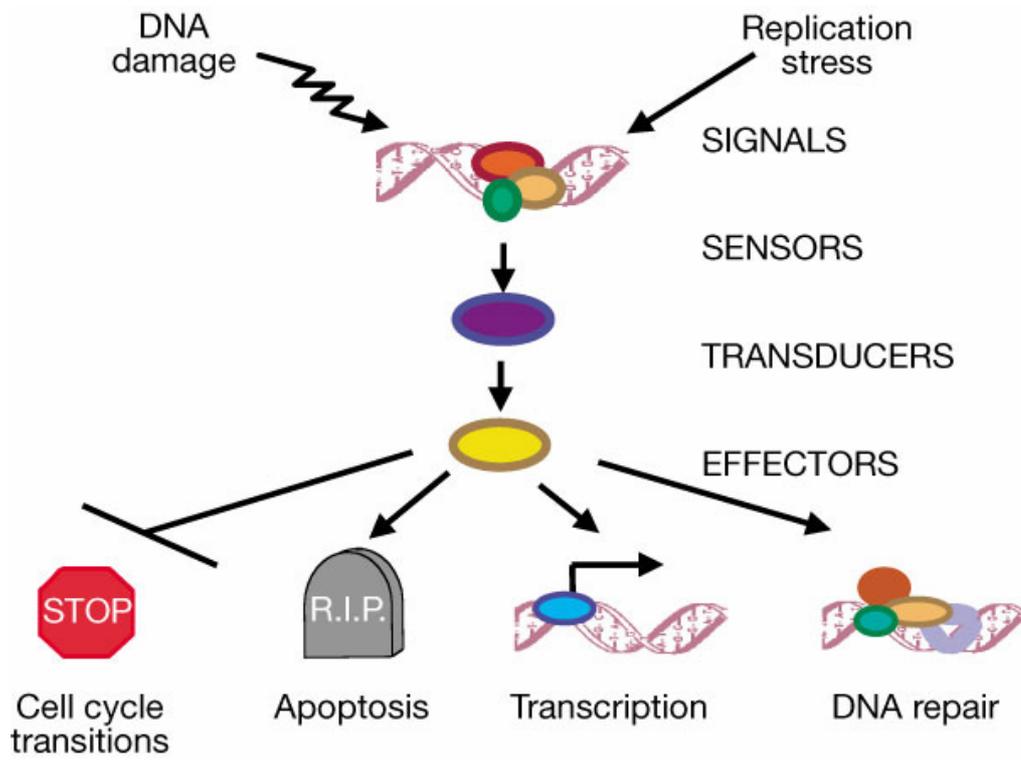
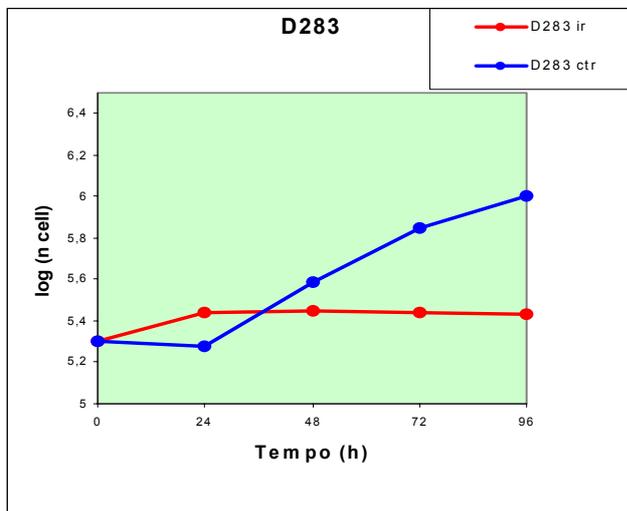
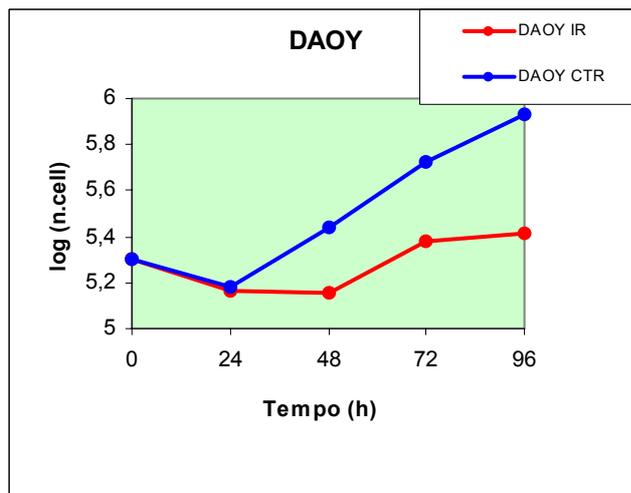


Fig.5 Network di pathway molecolari che interviene nella risposta al danno da RI. Comprende sensori, mediatori, trasduttori ed effettori (riprodotta da Zhou B-B s et al., 2000).



a)

D283 C: DT=37H
D283 IR: DT>72H



b)

DAOY C: DT=26,5H
DAOY IR: DT>72H

Fig.6 Curve di crescita di a) D283MED e b) DAOY irradiate (IR, linea rossa) e non irradiate (C, linea blu); a fianco sono indicati i tempi di duplicazione (DT).

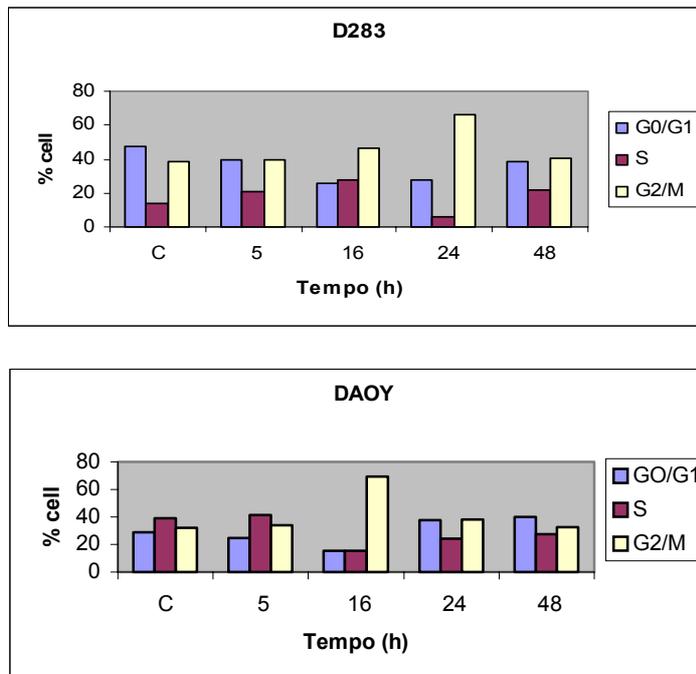


Fig.7 Ciclo cellulare di D283MED e DAOY a 5, 16, 24 e 48 ore dalle RI e dei relativi controlli (C); gli istogrammi rappresentano la media delle percentuali di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare ottenute in tre esperimenti indipendenti.

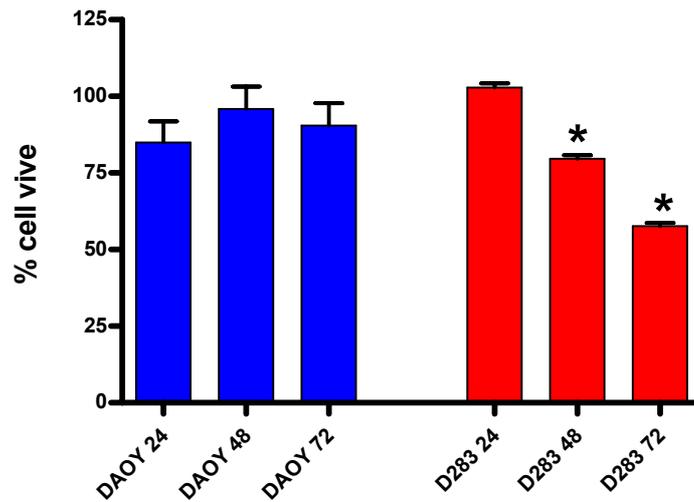


Fig.8 Vitalità cellulare di DAOY (barre blu) e D283MED (barre rosse) a 24, 48, 72 ore dalle RI. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori ottenuti in tre esperimenti indipendenti e rispettivamente 84.95%, 95.88% e 90.46% (DAOY); 102.88%, 79.66% e 57.63% (D283MED). Con l'asterisco sono indicate le differenze significative ($P < 0.05$) tra i trattati e i controlli (% cellule vive dei controlli = 100%)

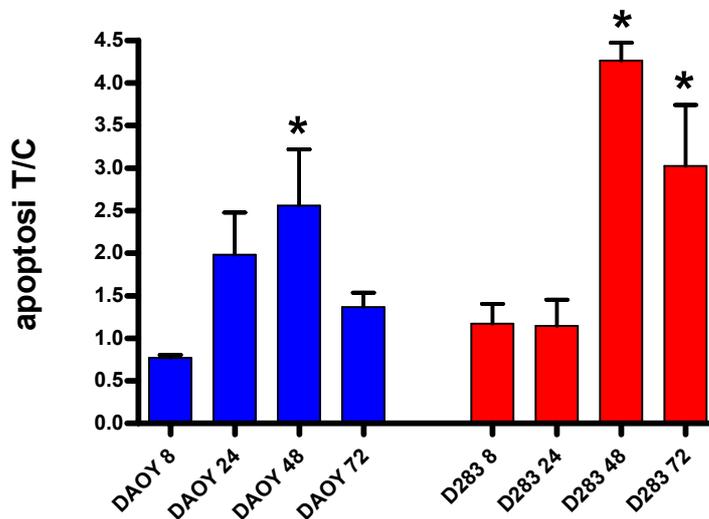


Fig.9 Apoptosi di DAOY (barre blu) e D283MED (barre rosse) a 8, 24, 48, 72 ore dalle RI. Gli istogrammi rappresentano la media dei rapporti tra i valori dei trattati e i relativi controlli ottenuti in tre esperimenti indipendenti. Con l'asterisco sono indicate le differenze significative ($P < 0.05$) tra i trattati e i controlli.

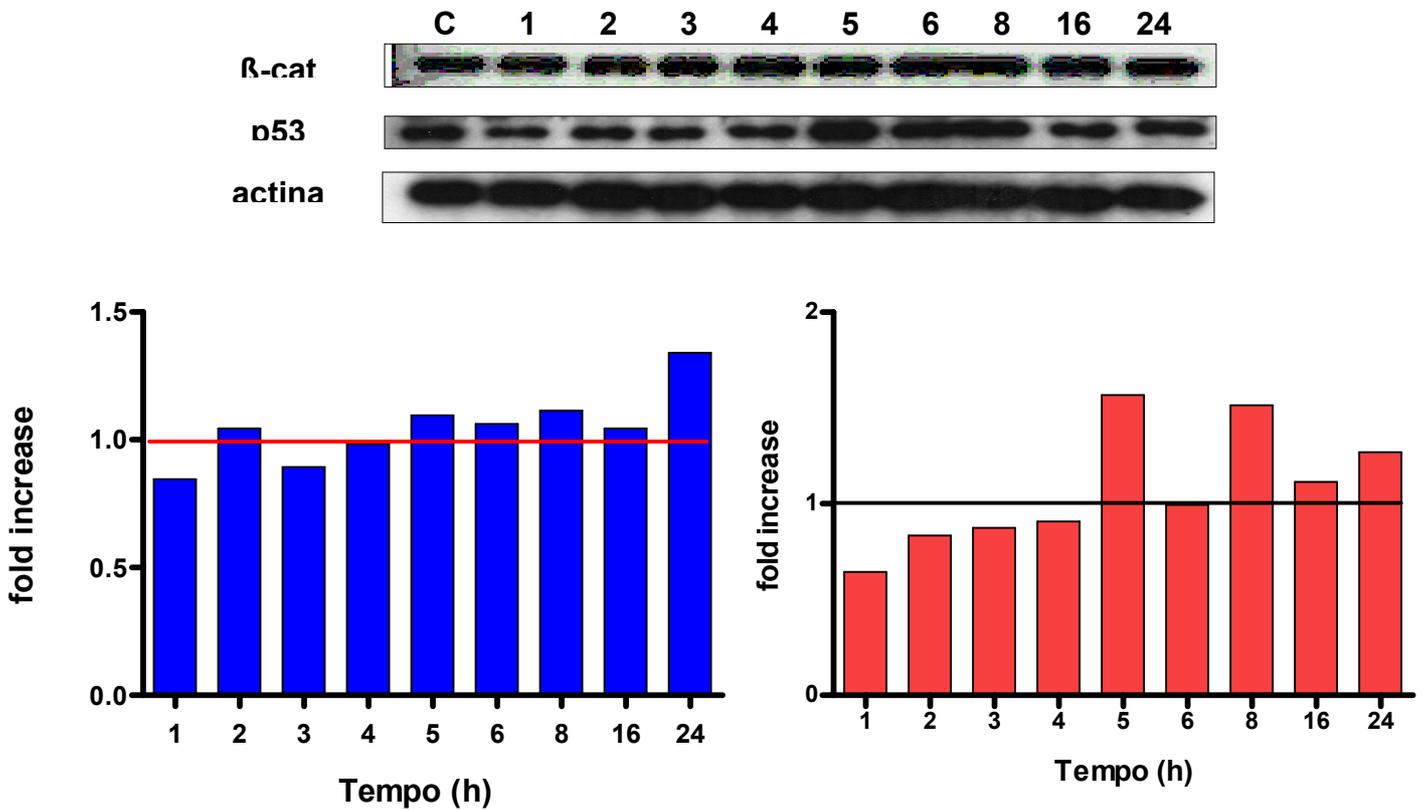


Fig.10 Espressione di β -catenina totale e di p53 nelle DAOY a diverse ere dalle RI. I valori di densità ottica (OD) di β -catenina e p53 sono stati normalizzati rispetto all'OD dell'actina. In basso gli istogrammi rappresentano la media dei valori di incremento rispetto al controllo (fold increase) ottenuti in tre esperimenti indipendenti. In alto è mostrato un esperimento rappresentativo; sono stati ottenuti risultati simili nei tre esperimenti.

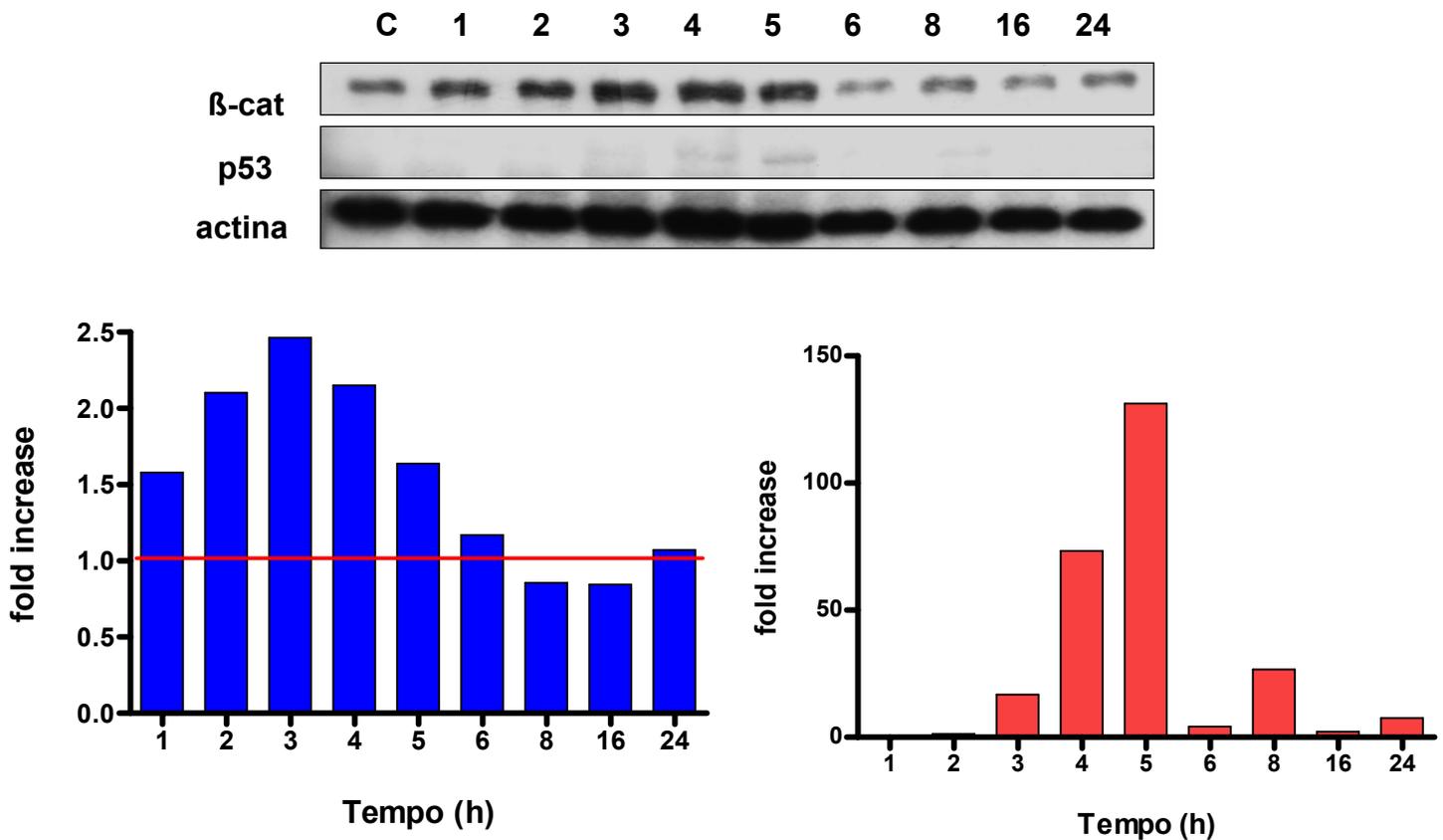


Fig.11 Espressione di β -catenina totale e di p53 nelle D283MED a diverse ere dalle RI. I valori di densità ottica (OD) di β -catenina e p53 sono stati normalizzati rispetto all'OD dell'actina. In basso gli istogrammi rappresentano la media dei valori di incremento rispetto al controllo (fold increase) ottenuti in tre esperimenti indipendenti. In alto è mostrato un esperimento rappresentativo; sono stati ottenuti risultati simili nei tre esperimenti.

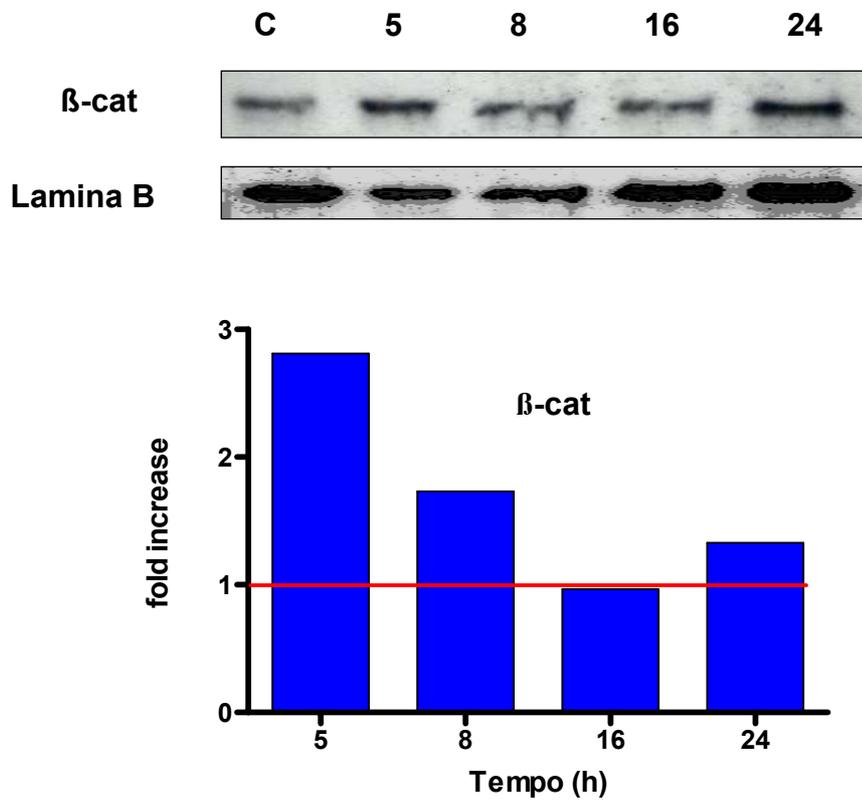


Fig.12 Espressione di β -catenina nucleare nelle DAOY a diverse ere dalle RI. I valori di densità ottica (OD) di β -catenina sono stati normalizzati rispetto all'OD della lamina B. In basso gli istogrammi rappresentano la media dei valori di incremento rispetto al controllo (fold increase) ottenuti in tre esperimenti indipendenti. In alto è mostrato un esperimento rappresentativo; sono stati ottenuti risultati simili nei tre esperimenti.

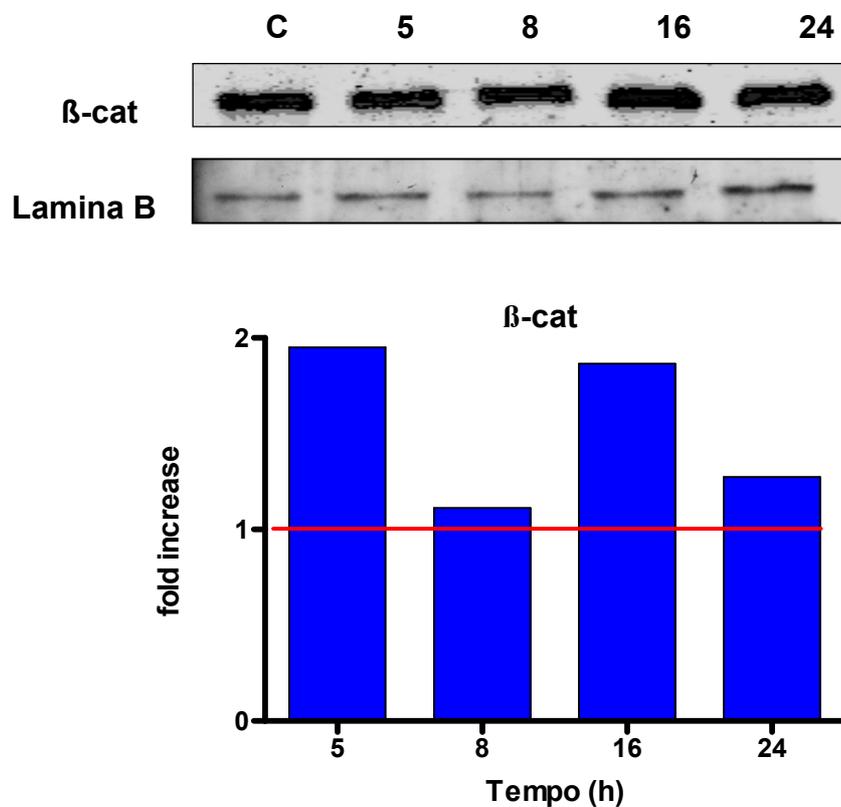


Fig.13 Espressione di β -catenina nucleare nelle D283MED a diverse ere dalle RI. I valori di densità ottica (OD) di β -catenina sono normalizzati rispetto all'OD della lamina B. In basso gli istogrammi rappresentano la media dei valori di incremento rispetto al controllo (fold increase) ottenuti in tre esperimenti indipendenti. In alto è mostrato un esperimento rappresentativo; sono stati ottenuti risultati simili nei tre esperimenti.

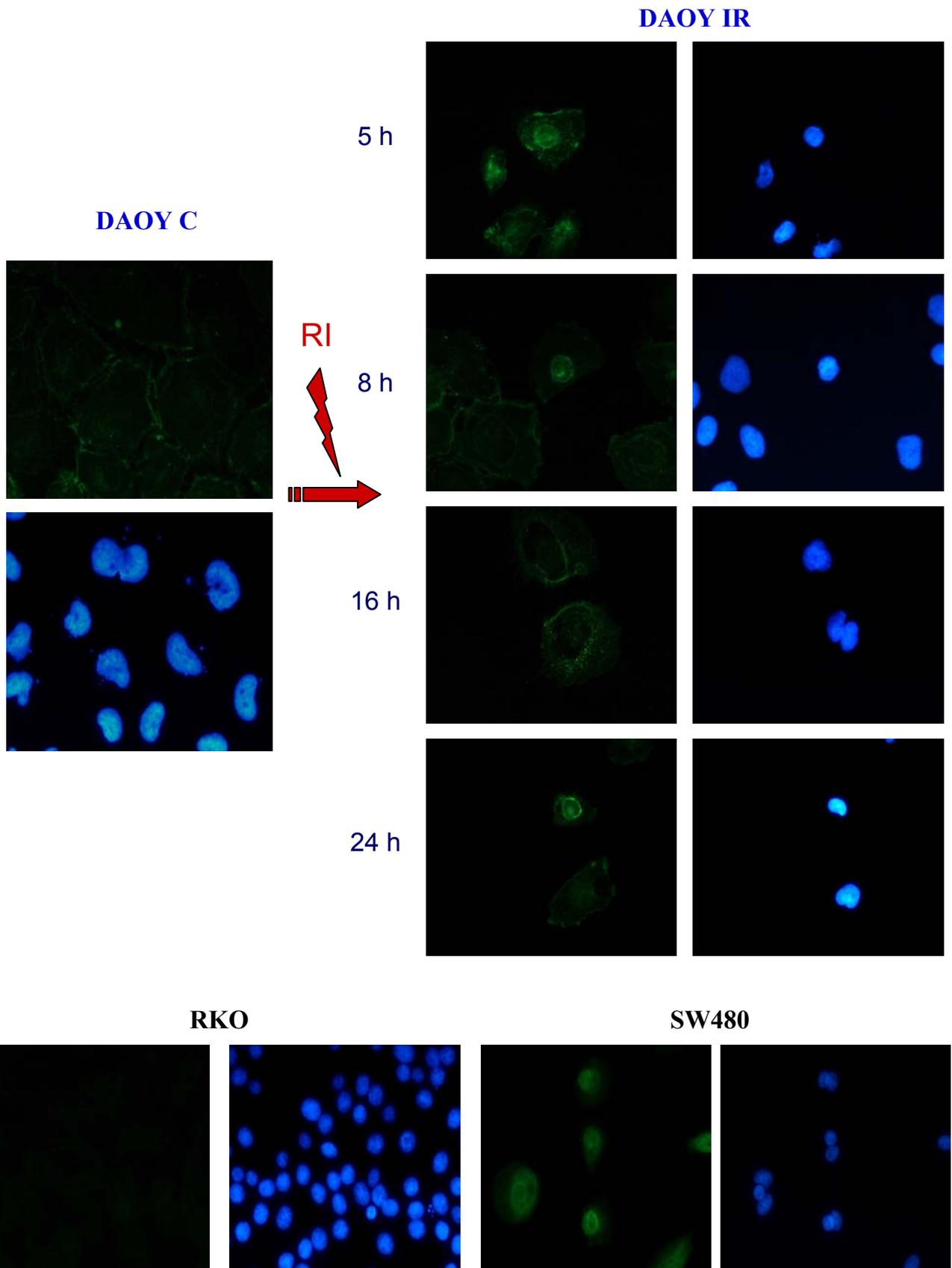


Fig.14 Localizzazione di β -catenina nelle DAOY a diverse ere dalle RI. La β -catenina è marcata in verde mentre i nuclei sono blu. Le RKO e le SW480 fungono da controllo.

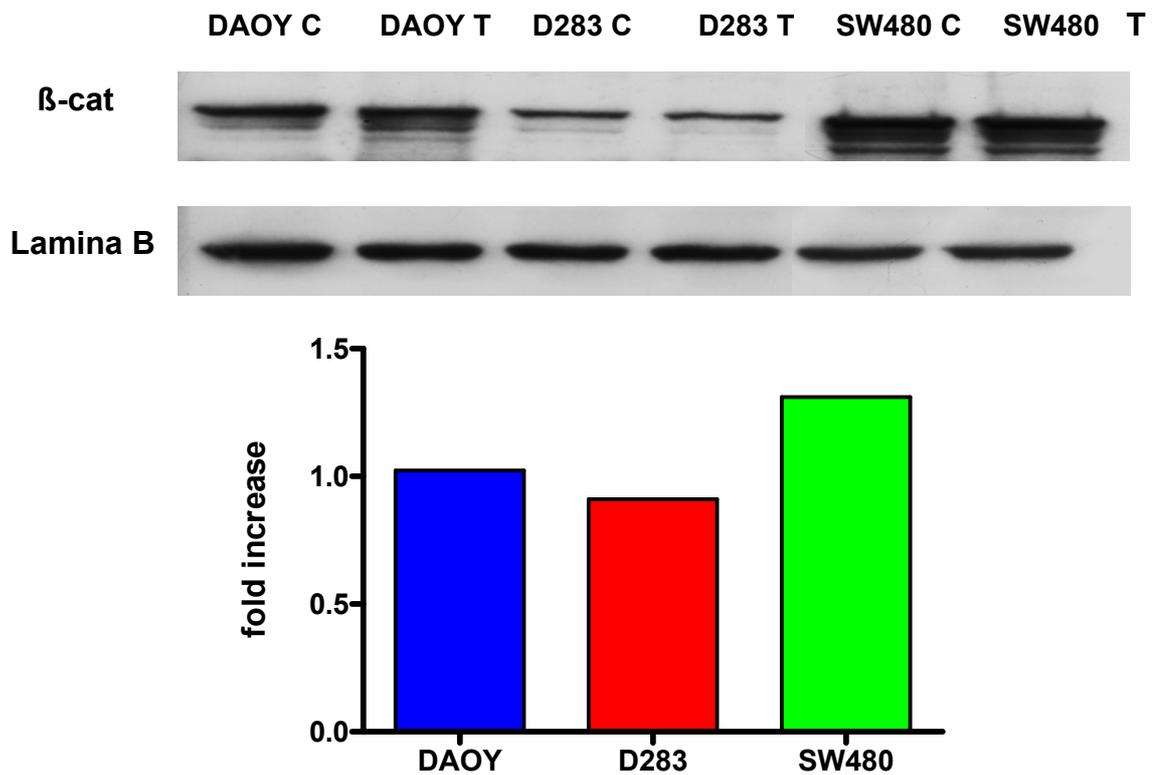


Fig.15 Espressione di β -catenina totale nelle DAOY, D283 MED e SW480 a 24 ore dal trattamento con LiCl 20mM. I valori di densità ottica (OD) di β -catenina sono stati normalizzati rispetto all' OD della lamina B. In basso gli istogrammi rappresentano la media dei valori di incremento rispetto al controllo (fold increase) ottenuti in tre esperimenti indipendenti. In alto è mostrato un esperimento rappresentativo; sono stati ottenuti risultati simili nei tre esperimenti.

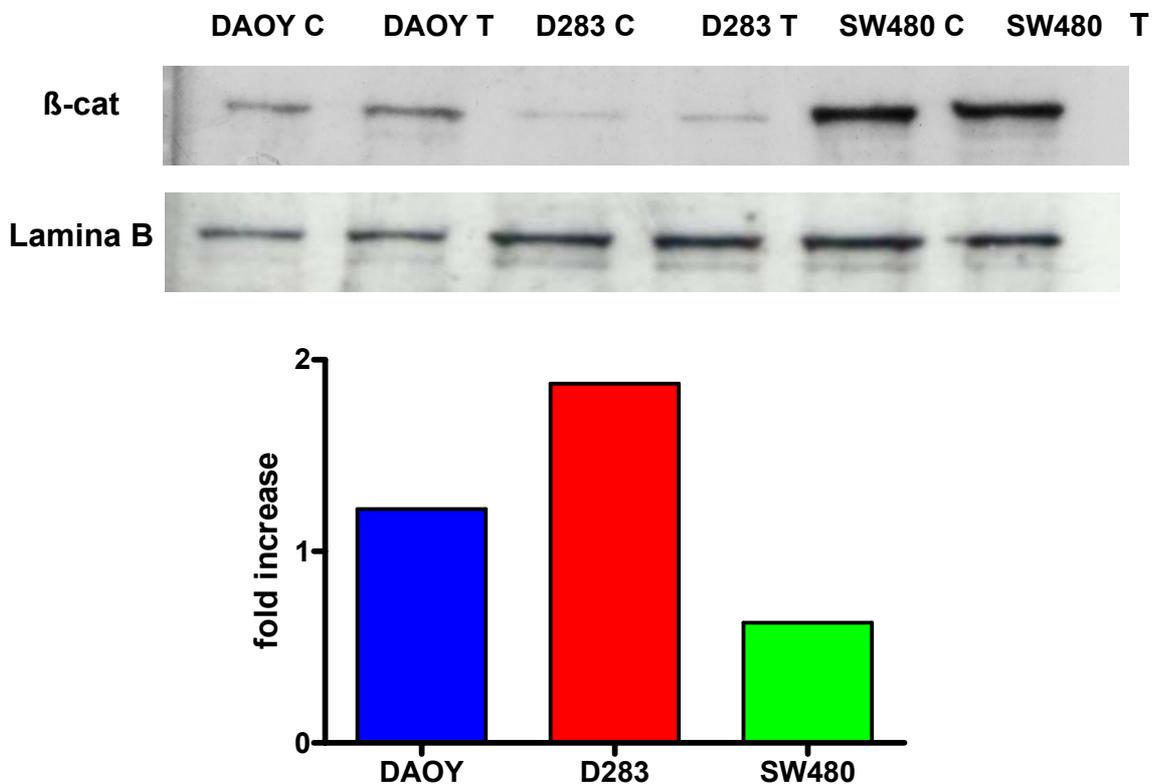
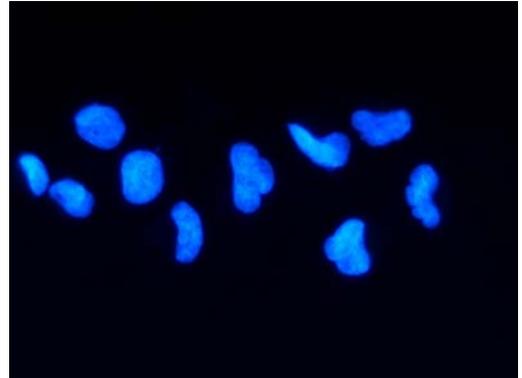
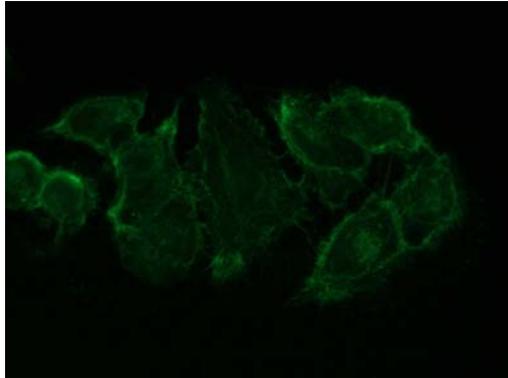
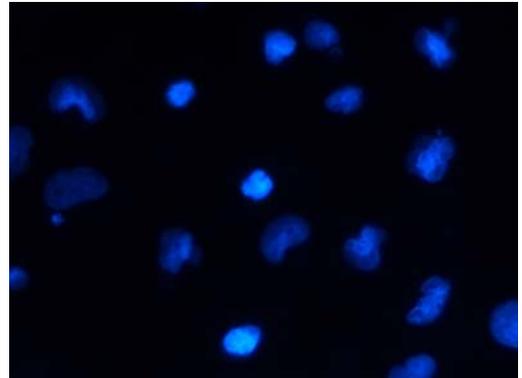
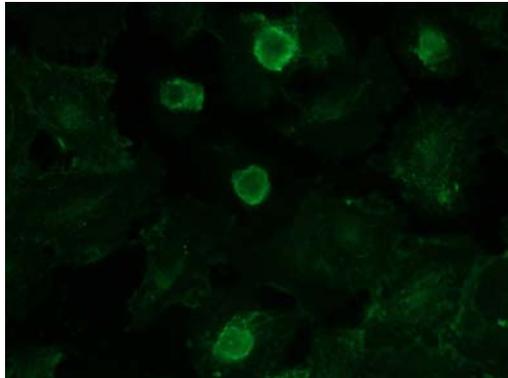


Fig.16 Espressione di β -catenina nucleare nelle DAOY, D283 MED e SW480 a 24 ore dal trattamento con LiCl 20mM. I valori di densità ottica (OD) di β -catenina sono stati normalizzati rispetto all' OD della lamina B. In basso gli istogrammi rappresentano la media dei valori di incremento rispetto al controllo (fold increase) ottenuti in tre esperimenti indipendenti. In alto è mostrato un esperimento rappresentativo; sono stati ottenuti risultati simili nei tre esperimenti.

DAOY C



DAOY T



SW480

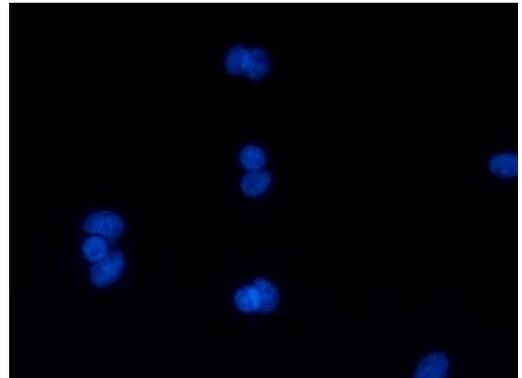
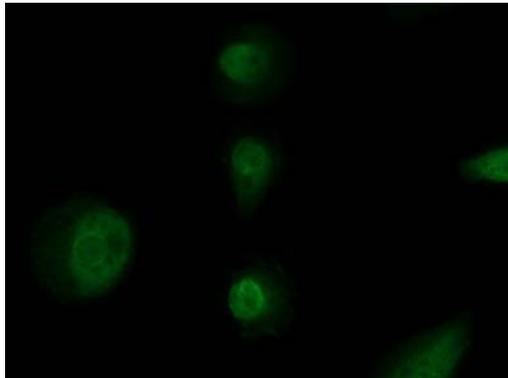
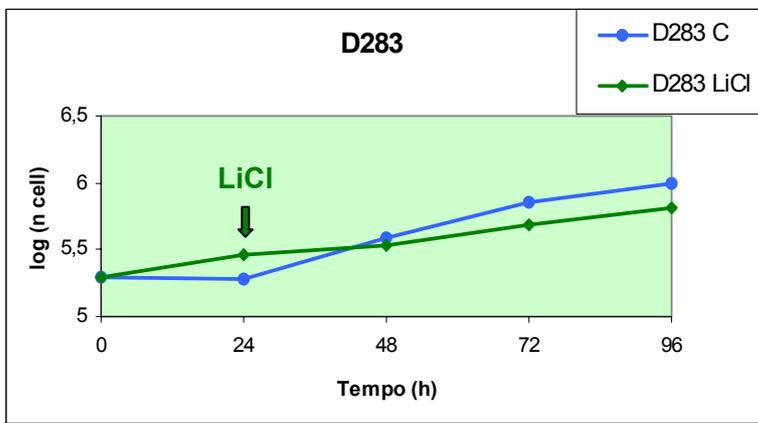
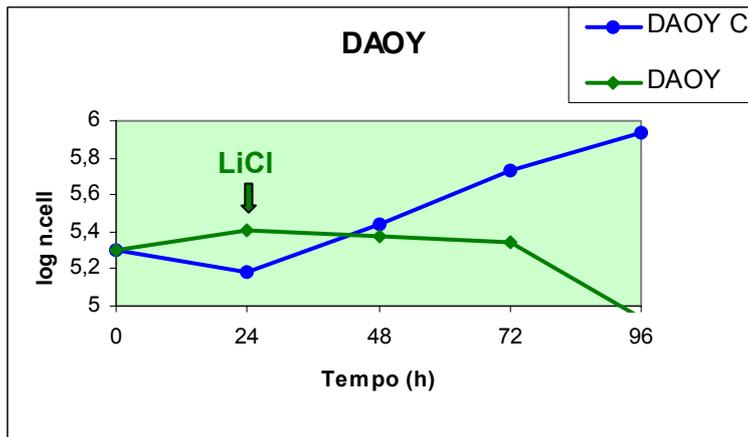


Fig 17. Localizzazione di β -catenina nelle DAOY a 24 ore dal trattamento con LiCl 20mM. La β -catenina è marcata in verde mentre i nuclei sono blu. Le SW480 fungono da controllo positivo della presenza di β -catenina nel nucleo.



a)

D283 C: DT=37H
D283 LiCl: DT=55H



b)

DAOY C: DT=26,5H

Fig.18 Curve di crescita di a) D283MED e b) DAOY trattate con LiCl 20mM (LiCl linea verde) e con NaCl 20 mM (C, linea blu); a fianco sono indicati i tempi di duplicazione (DT).

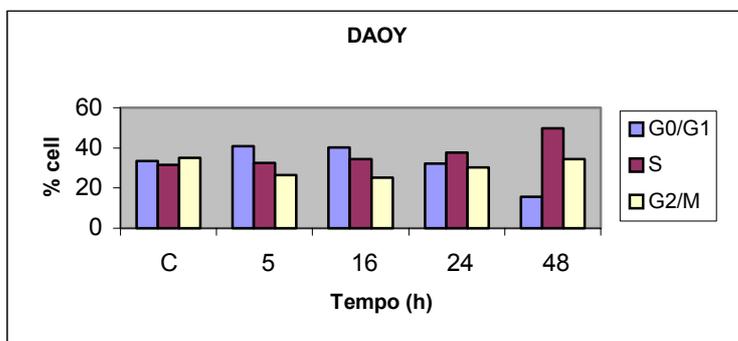
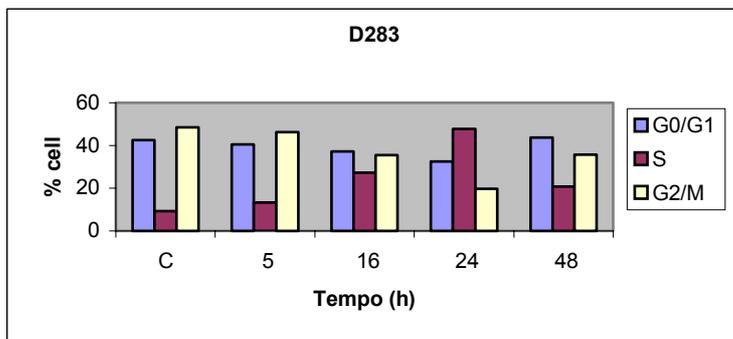


Fig.19 Ciclo cellulare di D283MED e DAOY a 5, 16, 24 e 48 ore dal trattamento con LiCl e dei relativi controlli (C); gli istogrammi rappresentano la media delle percentuali di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare ottenute in tre esperimenti indipendenti.

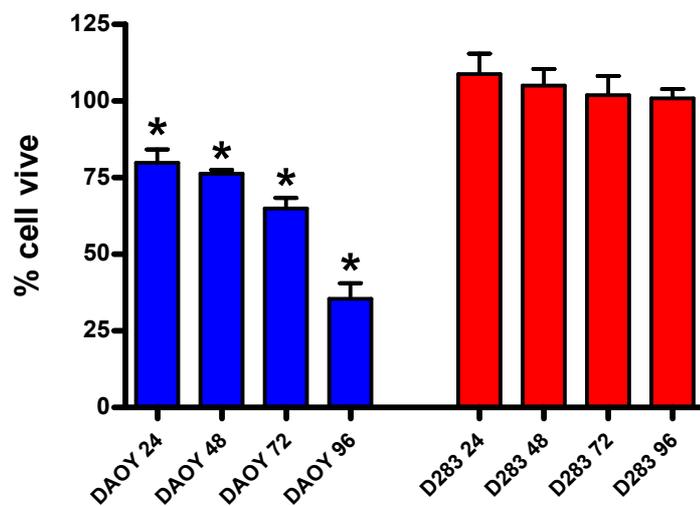


Fig.20 Vitalità cellulare di DAOY (barre blu) e D283MED (barre rosse) a 24, 48, 72 ore dal trattamento con LiCl. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori ottenuti in tre esperimenti indipendenti. Con l'asterisco sono indicate le differenze significative ($P < 0.05$) tra i trattati e i controlli (% cellule vive dei controlli = 100%).

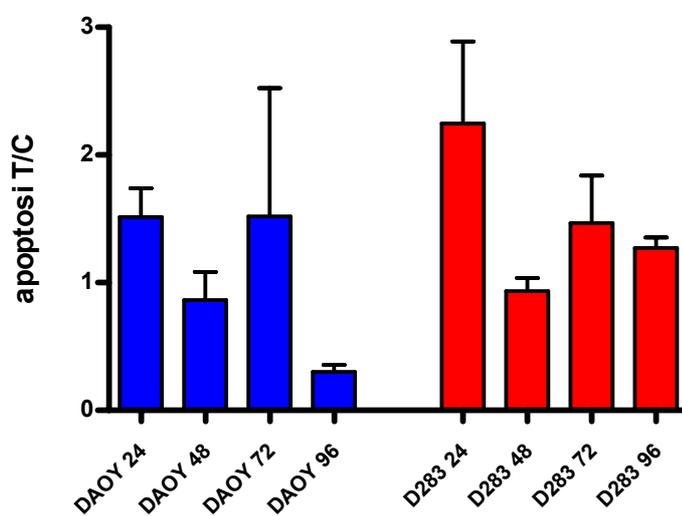


Fig.21 Apoptosi di DAOY (barre blu) e D283MED (barre rosse) a 24, 48, 72, 96 ore dal trattamento con LiCl. Gli istogrammi rappresentano la media dei rapporti tra i valori dei trattati e i relativi controlli ottenuti in tre esperimenti indipendenti.

RINGRAZIAMENTI

Leggere che il Dottorato di Ricerca è il più alto livello di istruzione in Italia mi emoziona e mi gratifica moltissimo. Non mi sembra nemmeno vero di avere quasi raggiunto questo traguardo.

Se sono arrivata fin qui lo devo al mio impegno, ma soprattutto a tutte le persone che hanno reso concreta questa opportunità di formazione e mi hanno fornito strutture e mezzi per svolgere l'attività più stimolante del mondo...la ricerca...almeno di provarci. Voglio quindi ringraziare tutte queste persone sperando di non dimenticarne nessuna.

In primis voglio ringraziare la mia tutor, la Prof.ssa Enza Barbieri, non solo per l'indubbia professionalità, ma anche e soprattutto per la grande fiducia e disponibilità dimostratemi. La considero davvero una grande professoressa e una grandissima persona.

Ringrazio tutto il "Radio 3°", in particolare il Dott. Enzo Lombardo e la Dott.ssa Silvia Cammelli per avermi dato tutte le informazioni tecniche e teoriche necessarie ad irradiare le mie cellule, il tutto con partecipazione e gentilezza non comuni.

Grazie anche a tutti gli addetti all'irradiatore cellulare che hanno "incastrato" i miei campioni tra altri permettendomi di rispettare sempre i tempi sperimentali.

Voglio poi ringraziare la Prof.ssa Giovanna Cenacchi, la prima a credere in me e a darmi la possibilità concreta di fare questa esperienza...e non solo questa! Con lei ho condiviso la progettazione del lavoro di ricerca e affrontato tutti i grandi e piccoli ostacoli in corso d'opera. GRAZIE DI TUTTO ma soprattutto di avermi insegnato a non arrendermi mai.

Grazie anche alla Dott.ssa Maria Alessandra Santucci per i preziosi consigli di radiobiologia, materia ostica e a me, inizialmente, piuttosto oscura.

Voglio poi ringraziare il Dott. Claudio Ceccarelli per avermi "accolto" nel suo laboratorio e per le "chiacchierate" scientifiche da cui ho colto molti e molti spunti.

Grazie al Prof. Giuseppe Nicola Martinelli, Direttore dell'UO Anatomia Patologica-Martinelli, per avermi messo a disposizione gli spazi e per la fiducia accordatami.

Grazie anche al Prof. Massimo Derenzini, Direttore della Sezione di Patologia Clinica del Dipartimento di Patologia Sperimentale, per avermi concesso l'uso dei suoi laboratori e per aver sopportato la mia presenza a volte "ingombrante".

Grazie al Prof. Lanfranco Masotti, del Dipartimento di Biochimica, Prof. Lucio Cocco, Presidente del Corso di Laurea Specialistica di Biotecnologie Mediche e al Prof. Martelli del Dipartimento di Anatomia Umana per avermi concesso l'uso dei citofluorimetri.

Ma senza le mitiche Dott.ssa Giovanna Farruggia, Dott.ssa Manuela Voltattorni e Dott.ssa Alessandra Cappellini non avrei mai potuto fare materialmente e capire le analisi al citofluorimetro. Grazie per la

professionalità, l'accuratezza e la simpatia delle vostre preziose consulenze.

Grazie al Prof. Lorenzo Montanaro, il mio guru, per la disponibilità, l'affetto e le pillole di saggezza.

Un grazie speciale al Dott. Tiziano di Tomaso, il mio braccio destro (ultimamente anche sinistro), neurone destro e grande amico. I motivi per ringraziarlo sono troppi, basti dire che senza di lui non ce l'avrei mai fatta.

Grazie anche ad Alice Ronchi e tutti gli altri interni, ormai dottori, perché ognuno a modo suo è stato prezioso e insostituibile. Grazie della simpatia, della disponibilità e della dedizione al lavoro.

Grazie alla Dott.ssa Manuela Vici, grande maestra di "buona pratica di laboratorio" e di vita.

Voglio ringraziare poi lo straordinario Alessandro Busi, per la disponibilità e la simpatia :è in grado di darmi una mano e di farmi fare un sorriso in ogni situazione.

Un grazie di cuore alla Dott.ssa Angela Nardi Pantoli e alla Dott.ssa Stefania Barbieri, mie ex-colleghe, ma non ex (grazie a loro) amiche. Mi hanno insegnato più di quello che credono e mi hanno allietato il tempo trascorso a "sperimentare"...ancora mi mancano tantissimo.

Grazie ancora alla Dott.ssa Arianna Corbu per l'affetto che mi ha dimostrato anche se i nostri inizi non sono stati dei migliori.

Grazie alla Dott.ssa Lucia Tarantino, alla Dott.ssa Lucilla Badiali e alla Dott.ssa Paola Preda per le chiacchiere e le ricette.

Grazie a Pippo e Bacco DI TUTTO: affetto, pranzi, coccole.

E ora voglio ringraziare le persone più importanti della mia vita senza le quali non sarei nulla, tanto meno un "dottore di ricerca". Mio marito Roberto e il nostro bimbo (che presto nascerà) Lorenzo, ai quali questa tesi è dedicata, mamma, papà, tata, nonna e tutti i miei adorati cuccioli per essere il mio sostegno e il mio conforto sempre e per sopportare (nel caso di Lorenzo ancora prima di nascere) la mia assenza e la mia irritabilità nei tanti momenti di stress.