

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dipartimento di Patologia Sperimentale

Dottorato di Ricerca in

Oncologia e Patologia Sperimentale: Progetto n. 1 "Oncologia"
Indirizzo Biologico-molecolare

Ciclo XXIII

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: MED/04

Attivazione del sistema Wnt in linee cellulari di medulloblastoma umano: valutazione della risposta biologica e della risposta alle radiazioni ionizzanti.

**Presentata da:
Dott.ssa Alice Ronchi**

**Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof. Sandro Grilli**

**Relatore
Chiar.ma Prof.ssa Enza Barbieri**

Esame finale anno 2011

SOMMARIO

INTRODUZIONE	3
1. IL MEDULLOBLASTOMA	3
1.1 GENERALITÀ	3
1.2 VARIANTI ISTOPATOLOGICHE E ISTOGENESI	4
1.3 GENETICA	9
1.4 CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE	24
1.5 FATTORI PROGNOSTICI E STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO	27
1.6 TERAPIA	34
2. IL PATHWAY WNT	40
2.1 GENERALITÀ	40
2.2 IL SISTEMA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE	41
2.3 B-CATENINA	45
2.4 WNT E ONCOGENESI	47
3. LA RISPOSTA BIOLOGICA ALLE RADIAZIONI IONIZZANTI	51
3.1 GENERALITÀ	51
3.2 LE RADIAZIONI IONIZZANTI	52
3.3 LA RISPOSTA BIOLOGICA ALLE RADIAZIONI	53
3.4 RUOLO DI B-CATENINA NELLA RISPOSTA ALLE RADIAZIONI IONIZZANTI	55
SCOPO	57
MATERIALI E METODI	59
1. LE LINEE CELLULARI	59
2. IL VETTORE PLASMIDICO	62
2.1 I PLASMIDI	62
2.2 RESTRIZIONE DEL PLASMIDE	63
2.3 SEQUENZIAMENTO DEL TRANSGENE	64
3. IDONEITÀ DELLE LINEE ALLA TRASFEZIONE	67
3.1 EFFICIENZA DI TRASFEZIONE	67
3.2 MORTALITÀ IN RISPOSTA A G418	68
4. LA TRASFEZIONE STABILE	70
4.1 IL TRASFERIMENTO GENICO	70
4.2 LA SELEZIONE ANTIBIOTICA	71
4.3 LA CLONAZIONE DELLE LINEE CELLULARI	71
5. ANALISI MOLECOLARI	74
5.1 REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI	74
5.2 WESTERN BLOTTING	78
5.3 IMMUNOFLUORESCENZA	82
6. ANALISI BIOLOGICHE	84
6.1 TRATTAMENTO CON LE RADIAZIONI IONIZZANTI	84
6.2 CURVA DI CRESCITA	84

6.3 MORTALITA' CELLULARE	85
6.4 SAGGIO DI INVASIONE	85
6.5 MORFOLOGIA CELLULARE	88
7. ANALISI STATISTICA	89
RISULTATI	90
1. IL MODELLO SPERIMENTALE	90
1.1 IL VETTORE PCI-NEO/B-CATENINS33Y	90
1.2 LE LINEE CELLULARI DI MB	90
1.3 TRASFESIONE DELLE UW228-1 E ISOLAMENTO DEI CLONI	91
2. CARATTERIZZAZIONE DELLE LINEE DI MB CON WNT ATTIVATO	92
2.1 PRESENZA DEL TRANSGENE B-CATENINS33Y	92
2.2 ESPRESSIONE E LOCALIZZAZIONE DI B-CATENINA	93
2.3 ESPRESSIONE DEI GENI BERSAGLIO CICLINA D1 E MYC	93
3. LA RISPOSTA BIOLOGICA IN SEGUITO AD ATTIVAZIONE DEL SISTEMA WNT	94
3.1 ALTERAZIONI NELLA CRESCITA CELLULARE	94
3.2 AUMENTO DEL TASSO DI MORTALITÀ	94
3.2 INIBIZIONE DELLA CAPACITÀ INVASIVA	95
3.3 ACCENNI DI DIFFERENZIAMENTO	95
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	98
BIBLIOGRAFIA	103
ICONOGRAFIA	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.

INTRODUZIONE

1. IL MEDULLOBLASTOMA

1.1 GENERALITÀ

DEFINIZIONE. Apparso per la prima volta nel 1925 in un pubblicazione di Bailey P. e Cushing H. [1], il Medulloblastoma (MB) è un tumore embrionale invasivo del cervelletto che si manifesta preferenzialmente nei bambini, mostrando prevalentemente differenziamento di tipo neuronale ed una notevole tendenza a metastatizzare. La classificazione della *World Health Organization* (WHO) inserisce il MB nei tumori di grado IV [2-5].

EPIDEMIOLOGIA. Con un tasso di incidenza annuale di 0.5 casi ogni 100000 bambini sotto i 15 anni, è il più frequente tumore cerebrale maligno dell'età pediatrica e rappresenta il 30% di tutti i tumori intracranici nei pazienti pediatrici. Colpisce prevalentemente bambini di età tra compresa tra 0 e 16 anni (70% dei casi), con un picco di incidenza che si colloca in corrispondenza del settimo anno. In età adulta, il MB insorge nell'80% dei casi in pazienti di età compresa tra i 21 e i 40 anni e solo raramente si presenta nella quinta decade di vita. E' più comune nei maschi che nelle femmine, con una percentuale di prevalenza maschile intorno al 65% [4].

LOCALIZZAZIONE. Almeno il 75% di MB nei bambini insorge a livello del verme del cervelletto e si proietta in direzione del quarto ventricolo. Il coinvolgimento degli emisferi cerebellari aumenta con l'età del paziente. La maggioranza di tumori localizzati negli emisferi appartengono alla variante istopatologica desmoplastica/nodulare [2].

CARATTERISTICHE CLINICHE. La manifestazione clinica di questa neoplasia include atassia del tronco, effetti sulla regolazione del movimento, sulla coordinazione e sull'articolazione del linguaggio. Inoltre è presente ipertensione intracranica, dovuta all'ostruzione del flusso del liquido cefalorachidiano (CSF) causata dalla massa tumorale, che può portare a cefalea e vomito. Possono essere inoltre presenti bradicardia, letargia, papilla da stasi e disturbi del comportamento, come irritabilità e apatia [6,7].

La diagnosi del MB si effettua mediante tomografia computerizzata (CT) o *Imaging* a risonanza magnetica (MRI) sia cerebrale che spinale, valutando pertanto l'eventuale presenza di metastasi (in particolare spinali, intradurali, extra-midollari) al momento della diagnosi [8].

Il MB ha un comportamento piuttosto aggressivo con una notevole tendenza a metastatizzare sia a livello del sistema nervoso centrale (SNC), attraverso il CSF, sia in sedi extra-neurali, come nelle ossa, nel midollo osseo, nei linfonodi, nel fegato e nei polmoni. Al momento della diagnosi, circa un terzo dei pazienti presenta disseminazione metastatica nel SNC e un piccolo, ma significativo, numero di pazienti presenta metastasi extra-neurali [9,10].

1.2 VARIANTI ISTOPATOLOGICHE E ISTOGENESI

MB CLASSICO. Nella maggioranza dei casi, il tumore è costituito da piccole cellule densamente stipate di forma rotondo-ellissoidale con un elevato rapporto nucleo/citoplasma e nuclei ipercromatici

che possono presentare forma ovale o triangolare (Figura 1a). Sono variabilmente presenti foci di necrosi e angiogenesi. In meno del 40% dei casi sono presenti rosette neuroblastiche (Homer Wright) caratterizzate, dal punto di vista ultrastrutturale, da cellule differenziate in senso neuroblastico con prolungamenti citoplasmatici di tipo neuritico, localmente adesi per la presenza di placche specializzate di adesione intercellulare. Questa tipica architettura può essere intervallata da cellule più indifferenziate. La grandezza e la morfologia dei nuclei può essere variabile, il che definisce il grado di anaplasia. Sebbene di solito siano numerose, le mitosi risultano rare nel 25% dei casi. La differenziazione più comune nel MB è di tipo neuronale, manifestata come immunopositività per marcatori neuronali. In aggiunta, piccoli gruppi di cellule francamente neurocitarie e gangli sono presenti in circa il 5% dei casi. Il differenziamento gliale è raro e si presenta sotto forma di piccoli gruppi dispersi di cellule con fenotipo astrocitario. Foci di necrosi o angiogenesi possono essere presenti, benché la proliferazione microvascolare sia molto meno accentuata rispetto ad altri tumori neuronali come i gliomi [2,3,11].

MB DESMOPLASTICO/NODULARE (~7% dei casi). Questa variante istopatologica è caratterizzata da zone nodulari libere da reticolina chiamate *pale island*, costituite da cellule marcatamente neurocitarie e scarsamente proliferanti. Queste zone sono circondate da cellule indifferenziate, densamente stipate e altamente proliferanti con nuclei ipercromatici e moderatamente pleomorfi che producono una densa rete di fibre di reticolina intercellulare (Figura 1b). Data l'estrema peculiarità di queste due zone che si contrastano l'un l'altra, valutare la presenza, l'estensione e l'architettura dei noduli nel MB è di primaria importanza dal punto di vista prognostico [2,3,11].

MB AD ESTESA NODULARITÀ (3% dei casi). Questo sottogruppo di tumori è connotato dalla struttura dei MB desmoplastici/nodulari,

connotata dalla presenza di cellule intranodali che mostrano elevata differenziazione in senso neuronale associata alla presenza di un feltro fibrillare [2,3,11] (Figura 1c).

MB A GRANDI CELLULE/ANAPLASTICO (12-25% dei casi). Il MB a grandi cellule e la variante anaplastica sono raggruppati in un *continuum* di malattia a prognosi infausta denominato LC/A. Questa variante si caratterizza per la presenza di cellule grandi e rotonde con nuclei pleomorfi e angolati e nucleoli singoli e prominenti (Figura 1d). In particolare un pleiomorfismo nucleare marcato e diverse atipie di forme cellulari concorrono a determinare il fenotipo anaplastico. Questa variante del tumore presentano un elevato indice apoptotico e mitotico, estese aree di necrosi e scarsa coesività intercellulare [11,12].

MB MELANOCITICO E MEDULLOMIOBLASTOMA: sono due forme estremamente rare di MB; in un primo momento considerate neoplasie cerebellari indipendenti sono attualmente annoverate nell'ambito delle diverse varianti di MB, in ragione di caratteri istopatologici, alterazioni genetiche e comportamento clinico comuni. Il MB melanocitico si differenzia dalla forma classica solo per la presenza di melanina nelle cellule, che si organizzano in *cluster* assumendo un aspetto epitelioido ed un'architettura tubulare o papillare. Il Medullomioblastoma presenta aspetti tipici del differenziamento rabdomioblastico, quali la formazione di fibrille muscolari o la presenza di cellule grandi, sparse, globulari con forte reattività alla desmina e caratteristiche rabdomioblastiche a livello ultrastrutturale [2,13].

CORRELAZIONI CON LE VARIANTI ISTOPATOLOGICHE. L'insieme delle varianti di MB si configura come uno spettro continuo, caratterizzato da un gradiente di differenziazione crescente, a partire dal MB a grandi cellule fino al MB ad estesa nodularità all'estremo opposto [4,5,9,14].

E' stato riportato che la classificazione istopatologica del MB correla con l'espressione di due oncogeni che codificano per fattori di trascrizione importanti a livello cerebrale e nello sviluppo degli organi sensoriali: *Orthodenticle homeobox 1* (OTX1) e *Orthodenticle homeobox 2* (OTX2). Tutti i MB esprimono OTX1 o OTX2 od entrambi: in particolare è stato osservato che l'mRNA di OTX2 correla tipicamente con l'istotipo classico, mentre l'espressione del solo mRNA di OTX1, e quindi l'assenza di OTX2, correla con la variante desmoplastica [15,16].

IMMUNOISTOCHEMICA. Il frequente differenziamento del MB in senso neuronale è manifestato immunofenotipicamente dall'espressione di antigeni neuronali. In diversi MB è stata dimostrata, almeno a livello focale, la positività per Tubulina β di classe III, proteina associata ai microtubuli 2 (MAP2), enolasi neurone-specifica (NSE) e sinaptofisina. Le rosette Homer Wright e le *pale island* del MB desmoplastico sono immunoreattive per questi marcatori. L'espressione delle proteine dei neurofilamenti (NFP), invece, si verifica meno comunemente [4].

La presenza di cellule positive per la proteina fibrillare acida della glia (GFAP) è ricorrente tra le cellule indifferenziate del MB classico, le quali presentano l'aspetto tipico degli astrociti reattivi e tendono ad essere più abbondanti nei pressi dei vasi sanguigni. Queste cellule sono normalmente considerate astrociti intrappolati, sebbene l'osservazione di cellule simili nelle metastasi extra-neurali sollevi la possibilità che almeno una parte di queste rappresenti astrociti neoplastici ben differenziati. In circa il 10% dei casi di MB classico, sono state osservate cellule immunopositive per GFAP e l'apparenza citologica di elementi neoplastici. Le zone nodulari del MB desmoplastico possono mostrare cellule fibrillari positive per GFAP. Inoltre cellule tumorali positive per GFAP possono essere inoltre trovate nelle aree internodali del MB a grandi cellule/anaplastico, anche se in rari casi [4]. L'immunofenotipo del MB include anche la reattività per vimentina,

nestina, molecole di adesione delle cellule neuronali, *nerve growth factor* (NGF) e proteine associate ai fotorecettori, quali la rodopsina e l'antigene-S della retina [4].

ISTOGENESI. La WHO annovera il MB fra i tumori embrionali del SNC ma una sua classificazione più precisa risulta difficile a causa della controversa istogenesi del tumore. Alcuni autori supportano l'ipotesi che il MB derivi da cellule progenitrici neuroectodermiche, come le cellule della matrice subependimale, altri invece dalle cellule dello strato dei granuli esterni (EGL) [8,17]. A lungo si è dibattuto se considerare il MB fra i tumori neuroectodermici primitivi (PNET) o come entità neoplastica a sé stante, poiché mentre la variante classica deriva dalla matrice germinale e quindi ha istogenesi assimilabile a quella dei PNET, quella desmoplastica/nodulare origina dai precursori neuronali dei granuli di cervelletto (GNPC) in seguito ad attivazione aberrante della via di segnalazione *Sonic Hedgehog* (SHH) [18]. Tuttavia il MB si differenzia dai PNET per diverse caratteristiche, prima fra tutte la sede preferenziale d'insorgenza a livello cerebellare rappresentata dalla zona infratettoriale nella fossa posteriore per il MB e dalla zona sopratettoriale per gli PNET. Inoltre sono state identificate mutazioni tumorigeniche diverse, suggestive del coinvolgimento di vie di segnalazione differenti nella formazione di questi tumori, e analisi di espressione genica su larga scala hanno mostrato che il MB ed i PNET hanno distinti profili molecolari [14]. Anche la risposta alla radioterapia (RT) e alla chemioterapia differisce in questi due tumori. L'orientamento attuale della WHO è pertanto quello di classificare il MB separatamente dai PNET [18].

Recentemente è stato osservato che un sottogruppo di MB, identificato dalla presenza di mutazioni attivanti il sistema *Wingless Type* (WNT), ha invece origine dalle cellule del tronco encefalico dorsale, distinguendolo così dagli altri sottogruppi di MB che originano nel cervelletto e così spiegando le marcate

differenze cliniche e molecolari tra i diversi sottogruppi di MB [19].

1.3 GENETICA

E' ampiamente noto che il MB sia un tumore geneticamente eterogeneo, sia in termini di popolazioni cellulari da cui origina sia in termini di sistemi molecolari che concorrono alla sua insorgenza [20,21]. Tipicamente le diverse varianti istopatologiche di MB hanno diversi meccanismi di patogenesi, risultanti dalla deregolazione dei normali programmi di crescita e sviluppo cerebellare [22]. La comprensione delle disfunzioni molecolari correlate al MB è importante non solo per spiegarne la formazione e la crescita, ma anche per le notevoli implicazioni che esse hanno in termini di aggressività e risposta alla terapia [23].

PREDISPOSIZIONE GENETICA. Nella maggior parte dei casi il tumore è sporadico, ma nel 10% dei pazienti si osserva una predisposizione genetica ereditaria come nella sindrome di Turcot di tipo 2, nella sindrome di Gorlin, nella sindrome Li-Fraumeni e nella sindrome di Rubinstain Taybi [24].

La sindrome di Turcot di tipo 2 è causata da mutazioni nella linea germinale del gene oncosoppressore *Adenomatous polyposis coli* (APC), coinvolto nel sistema molecolare di trasduzione del segnale WNT, ed è caratterizzata dalla presenza concomitante di tumori cerebrali primitivi, tra cui il MB, e di Poliposi adenomatosa familiare (FAP) [25].

La sindrome di Gorlin, definita anche sindrome dei nevi multipli basocellulari (NBCCS) o di Leopard, è riconducibile a mutazioni ereditarie nel recettore *Patched* (PTCH), appartenente al sistema di segnalazione SHH e consiste in carcinomi multipli a cellule basali (epiteliomi), cisti mandibolari multiple, anomalie vertebrali, della colonna (solitamente spina bifida) e calcificazioni della *falx cerebri* [26,27].

La sindrome di Li-Fraumeni è associata a mutazioni ereditarie a livello del gene oncosoppressore TP53, responsabili di un *pattern* di tumori abbastanza vario nei familiari affetti; si riscontrano infatti neoplasie multiple e di diverso tipo, ad insorgenza precoce, sia a livello del SNC, tra cui il MB, sia in altre sedi [28].

La sindrome di Rubinstein-Taybi è ascrivibile a mutazioni germinali a carico di due geni: il gene *CREB binding protein* (CREBBP) ed il gene *E1A binding protein p300* (EP300), codificanti per due proteine che fungono da istone-acetiltransferasi (HATs). Queste regolano la trascrizione rimodellando la cromatina e giocano un ruolo importante in diverse vie di segnalazione tra cui il WNT. La perdita di funzione (*loss of function*) di queste HATs si estrinseca in un quadro sindromico tipico, quale bassa statura, *facies* caratteristica, particolari dismorfie (pollici e alluci larghi), ritardo mentale severo ed i soggetti affetti da questa sindrome presentano un rischio aumentato di sviluppare tumori, tra cui il MB [29].

ALTERAZIONI GENETICHE. Nel MB sono state identificate diverse alterazioni a livello del cariotipo (Figura 2), prime fra tutte quelle che coinvolgono il cromosoma 17 (38-54% dei casi), a livello del quale si può avere perdita di materiale genetico dal braccio corto (17p) o acquisizione di materiale genetico sul braccio lungo (17q); la concomitanza di tali eventi citogenetici porta alla formazione dell'isocromosoma i(17)(q10) [30-32]. Verosimilmente l'elevata frequenza di perdita del 17p nel MB (23-28%) suggerisce che, a questo livello, siano presenti importanti geni oncosoppressori o oncogeni correlabili alla patogenesi della neoplasia, ma non ne è stato ancora chiarito il motivo. Un gene candidato è TP53, situato sul braccio corto del cromosoma 17, che però risulta mutato in una bassa percentuale di casi (~10%) rispetto all'elevata frequenza dell'aberrazione cromosomica nel MB [33]. Il gene oncosoppressore *hypermethylated in cancer 1* (HIC1), 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 [34].

Altra anomalia cromosomica frequente nel MB è la perdita dell'intero cromosoma 6 (Figura 3c). Tipicamente questa alterazione individua un particolare sottogruppo molecolare di MB caratterizzati da una forte attivazione del sistema WNT, presente nel 25% dei MB (Figura 3a-b), ed è correlabile ad una prognosi favorevole del tumore, anche se i meccanismi sottesi devono ancora essere chiariti [35]. Altre delezioni invece riscontrate nel MB sono perdita del 16q (16-17%), 8p (15-22%), 10q (21%), 11q (11-16%) e 9q (8%) [36].

L'amplificazione del protooncogene *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog* (MYC alias c-Myc) è stata identificata nel 4-10-15% dei MB primari ed è associata soprattutto al sottotipo di MB a grandi cellule/anaplastico [37-39]. Un recente studio ha messo in luce il ruolo di MYC nell'apoptosi indotta da radiazioni ionizzanti (RI). Gli effetti della sua sottoregolazione sono stati indagati in due linee cellulari di MB (DAOY e D341) mediante l'utilizzo di *small interference RNA* (siRNA): l'inibizione di MYC ha dimostrato avere non solo azione anti-proliferativa, inducendo un blocco p21-mediato del ciclo cellulare in fase G1 e conseguente arresto della crescita, ma anche azione inibitoria sull'espressione e l'attività delle telomerasi e azione anti-apoptotica, aumentando così la resistenza alla RT [40]. Anche la frequenza dell'amplificazione di *v-myc myelocytomatosis viral related oncogene neuroblastoma derived* (MYCN alias N-myc) è variabile, ma generalmente ricade in un intervallo simile a quello di MYC. Il ruolo di MYCN nella patogenesi del MB è meno chiaro rispetto a quello di MYC: la sua espressione sembra essere regolata dal *pathway* SHH, sia nell'embriogenesi del cervelletto che nel MB, fornendo così un legame tra sviluppo e neoplasia. Rimane comunque da chiarire se l'espressione di MYCN sia associata alla progressione della malattia o al fenotipo anaplastico [37].

Altri *loci* cromosomici che includono potenziali oncogeni comunemente acquisiti nel MB sono 7q21 (*cyclin-dependent kinase 6*, CDK6), 5p15 (*telomerase reverse transcriptase*, hTERT) 14q22 (OTX2) ed è stata identificata anche l'acquisizione delle porzioni cromosomiche 1q e 8q (regione minima 8q23-q24). L'associazione tra l'acquisizione del braccio lungo del cromosoma 8 (8q) e la progressione tumorale è riconducibile ad una serie di geni che mappano a questo livello quali *MYC*, *Eukaryotic Translation Elongation Factor 1D* (EEF1D) e le proteine ribosomiali *ribosomal protein L30* (RPL30) e *ribosomal protein S20* (RPS20). Evidenze sempre maggiori indicano che la regolazione aberrante dei ribosomi, dei loro componenti e delle loro funzioni possono essere collegate alla trasformazione cellulare. Inoltre diversi oncogeni e oncosoppressori quali *MYC* e *MYCN* regolano l'espressione dell'rRNA e delle proteine ribosomiali. Pertanto una deregolazione della biosintesi e della biogenesi ribosomiale potrebbe avere esito in un'alterazione della crescita cellulare e quindi nell'aumentata proliferazione tipica dei tumori [41,42].

IL PATHWAY SHH. Queste via è una cascata di segnalazione mediata da una serie di proteine, quali *PTCH*, *Smoothed homolog* (SMO) ed il complesso multimerico (MCP), il quale comprende *Fused homolog* e *Suppressor of Fused homolog* (SUFU), che fisiologicamente regolano la proliferazione delle cellule dei granuli cerebellari esterni. Il *pathway* è innescato da SHH, una glicoproteina abbondantemente secreta durante lo sviluppo cerebellare dalle cellule del Purkinje ed uno dei principali mitogeni delle cellule progenitrici dei granuli. SHH è il ligando specifico di *PTCH*, un recettore a dodici domini trans-membrana, espresso principalmente nei precursori dell'EGL. *PTCH* ha la funzione di inibire SMO, una proteina G a sette passaggi trans-membrana e dotata di intrinseca attività catalitica e di segnalazione. La repressione di SMO da parte di *PCHT* fa sì che *GLI family zinc finger* (GLI) 1 resti sequestrato a livello del

citoplasma nel complesso multiproteico *Fused-SUFU*: GLI1 non può traslocare al nucleo per svolgere la sua funzione di attivatore trascrizionale, mentre GLI2 e GLI3 sono attivati per taglio proteolitico e fungono da repressori trascrizionali. Pertanto in assenza di SHH, PTCH reprime SMO e il *pathway* risulta inattivo. Il legame di SHH a PTCH invece dereprime SMO, il complesso *Fused-SUFU* viene disassemblato e rilascia GLI1: quest'ultimo trasloca al nucleo e avvia la trascrizione genica, mentre l'attivazione di GLI2 e GLI3 viene bloccata. Tra i geni bersaglio di GLI1 ricordiamo: GLI1 stesso, i geni codificanti per i fattori WNT, PTCH, MYCN e MYC.

Mutazioni di PTCH sono state identificate in circa il 20% dei MB umani, di SUFU nel 9% e di SMO in circa il 5% e queste mutazioni sono risultate associabili a varianti con morfologia preferenzialmente, ma non esclusivamente, desmoplastica [22,23].

La perdita del braccio corto del cromosoma 17 è stata identificata come possibile causa della deregolazione del sistema molecolare SHH, per la perdita del gene *potassium channel tetramerisation domain containing 11* (REN alias KCTD11). Esperimenti *in vitro*, dimostrano infatti che una sovraregolazione di REN porta ad arresto della crescita e avvia il differenziamento terminale delle cellule dei granuli di cervelletto, antagonizzando così gli effetti dell'attivazione del *pathway* SHH; la perdita di REN implica quindi la rimozione di tale limite all'espansione di cellule immature, favorendo lo sviluppo del tumore [15].

E' stato dimostrato un importante *cross-talk* tra i sistemi di segnalazione SHH e quello mediato dall'*insulin-like growth factor* (IGF) nella patogenesi del MB: in modelli murini di MB SHH-indotti, quali topi *Ptch1 +/-* o *NeuroD2-SmoA1* (ovvero topi con mutazioni attivanti in PTCH o SMO rispettivamente), si è visto che, in assenza di SHH, il legame di IGF al suo recettore attiva l'effettore *Insulin receptor substrate 1* (IRS1), che concorre esclusivamente alla

sopravvivenza dei precursori neuronali; in presenza di SHH invece, IRS1 risulta sovraespresso, per aumentata trascrizione e stabilizzazione del trascritto, stimolando anche la proliferazione dei GNPC. In questo senso IRS1 costituisce il tramite con cui SHH e IGF concorrono, congiuntamente, alla progressione neoplastica [43]. Un altro studio conferma questo *overlapping* tra SHH e IGF: in topi *Ptch1 +/-*, la perdita di eterozigosi (*loss of heterozygosity*, LOH) di IGF2 sembra reprimere la formazione di MB [44], mentre la coespressione di IGF2 e di *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1* (AKT alias PKB) ne aumenta l'incidenza [23]. Inoltre è stato osservato che IGF2 è inizialmente assente nel MB e ne viene indotta l'espressione ad uno stadio avanzato, il che suggerisce un suo ruolo pregnante di IGF nella progressione tumorale, ma non nella trasformazione neoplastica [44].

Si è visto che l'inibizione di SMO ha un'importante ripercussione sull'oncogenesi: il trattamento di MB murini con la ciclopamina, che blocca l'attività di SMO, inibisce la proliferazione *in vitro* ed induce il differenziamento neuronale di linee tumorali mentre *in vivo* determina la regressione di tumori murini e la morte cellulare in tumori primari umani dopo la resezione. Inoltre l'HhAntag, inibitore di SMO, in topi *Ptch -/+ p53 -/-* blocca la crescita tumorale [23].

IL PATHWAY NOTCH. Le proteine NOTCH sono dei recettori transmembrana, altamente conservati nel corso dell'evoluzione, la cui segnalazione è cruciale per il mantenimento, il differenziamento e la determinazione del destino dei precursori cerebellari. Il *pathway* media infatti tanto la proliferazione e la sopravvivenza fisiologica delle cellule normali, quanto quella aberrante delle cellule neoplastiche [45-48]. La deregolazione di NOTCH è ritenuta responsabile della progressione tumorale, in particolare nel MB, nella misura in cui concorre a conservare le "MB *stem-cells*", inibendo sia la progressione del ciclo cellulare, e quindi il differenziamento, che l'apoptosi [45-48]. Nei vertebrati

sono stati identificati almeno quattro recettori NOTCH (NOTCH 1-4) e diversi ligandi appartenenti alle famiglie *Jagged* (JAG-1 e JAG-2) e *Delta like ligand* (DLL-1, DLL-3 e DLL-4), la cui interazione col recettore innesca la cascata di segnalazione: la γ -secretasi media il clivaggio proteolitico del dominio intracellulare di NOTCH, questo trasloca al nucleo dove forma un complesso con la proteina *C-repeat/DRE-Binding Factor* (CBF1), che lega il DNA attivando uno specifico programma di trascrizione dei geni effettori *hairy and enhancer of split 1 e 5* (HES1 e HES5) [47,48].

E' stato osservato che gli inibitori della γ -secretasi, come ad esempio il GSI-18, ostacolano l'oncogenesi bloccando il *signalling* HES1-mediato: la proliferazione cellulare *in vitro* diminuisce in seguito al trattamento con GSI-18, mentre viene indotto il differenziamento neuronale. *In vivo* in un modello di topi pretrattati con GSI-18 e poi sottoposti a xenotrapianto, le cellule staminali necessarie alla formazione del tumore sono deplete e di conseguenza l'oncogenesi risulta soppressa [46].

Un altro studio ha dimostrato che inibendo farmacologicamente il clivaggio di NOTCH, in quattro linee cellulari di MB umano (D283MED, D341, DAOY e UW228), si ottiene una diminuzione dose-dipendente del numero di cellule vitali a 48 ore dal trattamento. Inoltre in topi sottoposti a xenotrapianto con le D283MED, in seguito al trattamento con molecole che prevengono il taglio proteolitico di NOTCH, si osserva inibizione della proliferazione ed aumento dell'apoptosi, suggerendo come la segnalazione NOTCH contribuisca alla crescita e al mantenimento del MB [49]. A conferma di ciò, un recente studio ha evidenziato che la sotto-regolazione di HES1, mediante iperespressione dello specifico microRNA-199b-5p, regola negativamente l'aggressività e la potenzialità metastatica del tumore, sia in linee cellulari di MB umano (DAOY e UW228) che in modelli murini indotti da xenotrapianto [50].

E' da rilevare il ruolo antitetico svolto dai sottotipi NOTCH1 e NOTCH2 sia nello sviluppo embrionale che nella crescita tumorale: l'espressione di forme troncate e costitutivamente attive dei due recettori in MB primari ha dimostrato che NOTCH1 è prevalentemente un effettore post-mitotico che promuove l'uscita dal ciclo cellulare e il differenziamento neuronale, mentre NOTCH2 ed HES1 mediano la crescita e la proliferazione cellulare. Ne consegue che NOTCH1 agisce da oncosoppressore, inibendo la crescita *in vitro* di cellule di MB, mentre NOTCH2 agisce da oncogene promuovendola [48,51]. L'iperespressione di NOTCH2 è stata infatti osservata nel 15% dei MB umani [50].

Modelli murini di MB esprimenti forme attive di SMO in precursori dei granuli (topi ND2:SmoA1) hanno evidenziato l'esistenza di un marcato *overlapping* tra i *pathway* NOTCH e SHH nella tumorigenesi e nella progressione tumorale: la concomitante espressione di geni *target* di SHH, quali GLI1 e NMYC, e di geni *target* di NOTCH, quali HES1 e HES5, in MB SHH-indotti ha suggerito che l'attivazione del *pathway* SHH sia sufficiente ad indurre l'attivazione del *signalling* NOTCH [49]. Inoltre recentemente è stato dimostrato il *crosstalk* tra queste due vie di segnalazione mediante analisi di *Chromatin immunoprecipitation* (ChIP) [52].

IL PATHWAY ERBB. I quattro membri della famiglia dei recettori tirosin-chinasici ERBB, ERBB1 (EGFR), ERBB2 (Her2/Neu), ERBB3 (Her3) e ERBB4 (Her4), mediano importanti processi come la proliferazione, l'apoptosi, la migrazione e il differenziamento cellulare. Essi, pertanto, da una parte regolano l'embriogenesi dei tessuti neuronali normali e, dall'altra, qualora deregolati, mediano lo sviluppo dei tumori cerebrali. Il legame del ligando specifico determina l'attivazione del recettore per dimerizzazione, ovvero la formazione di omodimeri o eterodimeri, che innesca la cascata delle *mitogen-activated protein* chinasi (MAPK alias ERK), AKT e *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT). Le vie di

traduzione del segnale AKT e ERK1/2 hanno effetti sulla proliferazione, il differenziamento cellulare, l'attivazione di componenti delle cascate metastatiche e angiogeniche: AKT attivata fosforila l'inibitore della proliferazione *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* (p21 alias CIP1 alias WAF1), determinando la traslocazione di tale fattore dal nucleo al citoplasma e aumento del tasso di proliferazione cellulare, inibizione dell'apoptosi p53-dipendente e attivazione dei componenti delle cascate metastatiche e angiogeniche [9,15].

Nella patogenesi del MB un ruolo rilevante è svolto da alcuni componenti di questa famiglia di recettori, in particolare ERBB2 ed ERBB4, la cui coespressione, identificata nel 54% dei MB, è *marker* di aggressività del tumore essendo associata ad una maggiore potenzialità metastatica. In particolare da studi su modelli cerebellari umani e murini emerge come l'espressione di ERBB2 e ERBB4 sia deregolata nel MB rispetto allo sviluppo normale: ERBB2, non rilevabile nel normale sviluppo cerebellare, risulta iperespresso nel MB (40% dei casi) ed è indicativo di una prognosi sfavorevole [53], così come l'iperespressione dell'eterodimero ERBB2/ERBB4 e dell'omodimero ERBB4 sembrano dare un significativo contributo all'iniziazione e alla progressione del tumore [54,55]. Dati recenti mostrano l'espressione nel MB di particolari varianti sia *justa-membrana* (JM) che *citoplasmatiche* (CYT) di ERBB4, derivanti da *splicing* alternativo: l'isoforma JM-c, non presente nel tessuto normale, e l'isoforma JM-d, presente oltre che nella neoplasia anche nel tessuto fetale del cervelletto ma non in quello adulto, suggeriscono la riattivazione di un *pattern* neuroectodermico primitivo nel MB; il rapporto tra le due isoforme CYT1:CYT2, equamente espresse nel tessuto normale, è notevolmente aumentato nel MB e correla con una maggiore proliferazione e aggressività del tumore [56]. Data l'associazione tra iperespressione di ERBB2 e potenziale metastatico del MB, alcuni inibitori come OSI-774 danno un contributo notevole nel

bloccare la disseminazione tumorale e l'espressione di geni pro-metastatici. Il Trastuzumab, anticorpo monoclonale per ERBB2, migliora la sopravvivenza in pazienti con tumore iperesprimenti il recettore specifico, con risultati limitati però dalla difficoltà nel superare la barriera emato-encefalica; l'impiego del JNJ-28871063, in grado di penetrare con più facilità nel SNC, sembra ottimizzare l'effetto di inibizione sulla progressione tumorale. [23]

IL PATHWAY HGF/MET. Un altro *pathway* coinvolto nella patogenesi del MB è quello attivato dall'*hepatocyte growth factor* (HGF) e il *met proto-oncogene* o *hepatocyte growth factor receptor* (MET). Il livello di espressione del recettore MET è significativamente correlato con una minor sopravvivenza dei pazienti. Sia HGF che MET sono frequentemente iperespressi nel MB, in particolare nella variante anaplastica/a grandi cellule. E' stato dimostrato sia su linee cellulari che su masse *in vivo*, che l'espressione deregolata di queste due proteine induce diversi aspetti di malignità, quali la crescita indipendente da ancoraggio, la proliferazione, la progressione nel ciclo cellulare e la sopravvivenza. Inoltre HGF sembra avere effetto citoprotettivo nei confronti dell'apoptosi indotta da chemioterapia [23].

In uno studio su linee cellulari di MB (DAOY e ONS76) si è riscontrato come HGF sia un potente regolatore dell'espressione di MYC, anch'esso *marker* di prognosi negativa. Inoltre questo spiega, almeno in parte, come l'iperespressione di MYC nel MB sia molto più frequente (34-61%) della sua amplificazione genica (4-17%). HGF sovraregola MYC sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale ed i meccanismi molecolari sottesi sembrano essere i seguenti: il legame di HGF a MET determina l'attivazione di MAPK/PhosphoInositide 3-Kinase (PI3K) e l'inibizione di Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) con conseguente traslocazione di β -catenina al nucleo, dove quest'ultima agendo da co-attivatore trascrizionale insieme ai fattori di trascrizione DNA-binding T-cell factor (TCF)/Lymphoid Enhancing Factor (LEF) media la trascrizione

di MYC. A livello funzionale, tramite l'induzione di *cyclin-dependent kinase 2* (CDK2), *E2F transcription factor 1* (E2F1) e l'inibizione di *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* (CDKN1B alias p27), MYC determina la progressione G0/G1 nel ciclo cellulare, sia nelle DAOY che nelle ONS76. Nelle DAOY, MYC mediante l'inibizione di *BCL2-like 1* (BCL2L1 alias BCLXL) e l'attivazione delle caspasi 3 e 9 induce l'apoptosi in risposta a chemioterapia e RT. In definitiva MET induce MYC e quest'ultimo media gli effetti del primo sulla proliferazione e sull'accrescimento, nonché sulla progressione del ciclo cellulare [57].

Data l'affinità tra il MB a grandi cellule/anaplastico ed il MB indotto da xenotrapianto di MYC/DAOY (cellule trasfettate con un vettore esprimente il gene di interesse), la cooperazione tra HGF/MET e MYC sembra essere implicata nella trasformazione neoplastica e nella proliferazione di tale variante dei MB [57].

In virtù del coinvolgimento di questa via di segnalazione nel promuovere l'aggressività del MB, nuove strategie terapeutiche promettenti sembrano essere rappresentate dagli anticorpi monoclonali anti-HGF e dagli inibitori di MET che, in associazione ai trattamenti convenzionali, potrebbero migliorare l'esito delle terapie [23].

IL PATHWAY P53. La proteina p53 ricopre un ruolo fondamentale nella regolazione della progressione del ciclo e del destino cellulare in condizioni di stress e danno genotossico. In assenza di stress, danni al DNA o deregolazione dei sistemi correlati, i livelli di p53 sono mantenuti bassi; aumentano significativamente a seguito di un insulto di varia natura: danni diretti al DNA, aberrazioni cromosomiche, attivazione di oncogeni, ipossia, accorciamento dei telomeri [58].

p53 è un oncosoppressore che funge, in prima istanza, da attivatore trascrizionale sequenza-specifico; le proteine codificate dai suoi geni bersaglio attivano diversi sistemi molecolari implicati

in fenomeni quali apoptosi, inibizione della progressione del ciclo cellulare, senescenza, differenziazione e riparazione del DNA. In virtù di queste molteplici potenzialità, mutazioni a carico di questo oncosoppressore o di geni dei *pathway* molecolari in cui è coinvolto, sono critiche ai fini dell'oncogenesi risultando infatti implicate in più del 50% dei tumori umani [59].

L'attività di p53 è regolata dalla molecola *Mdm2 p53 binding protein homolog* (MDM2), oncogene sovraespresso in un numero significativo di tumori. MDM2 lega p53 inattivandola attraverso due meccanismi distinti: da una parte MDM2, occupando il dominio N-terminale di p53, deputato alla transattivazione, compete 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 *p53 binding site* (p53BS) 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 [58].

Oltre alla funzione di attivatore trascrizionale, p53 può anche reprimere la trascrizione di un ampio gruppo di promotori [60]; in particolare è in grado di inibire selettivamente uno o più geni anti-apoptotici tra cui *B-cell CLL/lymphoma 2* (BCL2), codificante per una proteina anti-apoptotica e la cui espressione è può essere bloccata da p53 [61,62]; l'effetto ultimo che ne risulta è essenzialmente sovrapponibile a quello che si ottiene in seguito all'attivazione trascrizionale di geni pro-apoptotici come *BCL2-associated X protein* (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 [53,63].

La patogenesi del tumore coinvolge diverse alterazioni del *pathway* p53: la perdita di TP53 accelera, ad esempio, lo sviluppo della neoplasia in modelli murini della malattia e nell'uomo la delezione di TP53 predispone all'insorgenza del MB, come avviene nella sindrome di Li Fraumeni [34,64]. Inoltre elevati livelli di p53 indicano che la proteina è presente in una forma mutata e non funzionante e sono associati a prognosi negativa [65]. Considerando anche le alterazioni degli altri componenti che partecipano alla risposta mediata da p53, come la delezione di *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A alias ARF) o la metilazione del suo promotore e l'iperespressione di MDM2, complessivamente si ha un coinvolgimento di questa via nel 20% circa dei MB sporadici [66]. Alterazioni del sistema via p53-ARF sono più frequenti nell'istotipo a grandi cellule/anaplastico, associato anche ad amplificazione di MYC: si ipotizza che, come avviene in altre neoplasie, l'amplificazione di 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 [67].

IL PATHWAY NT/TRK. Per ciò che concerne l'espressione di *neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3* (NTRK3 alias TRKC) e *neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1* (NTRK1 alias TRKA) identificata nel MB, è stato dimostrato *in vitro* che l'attivazione di questi recettori da parte delle neurotrofine promuove la differenziazione di precursori neuronali. La famiglia dei fattori neurotrofici include NGF, *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), le *neurotrophin 3* (NTF3 alias NT-3), 4 (NTF4 alias NT-4/5) e 6 (NTF6 alias NT-6), che si legano con alta affinità ai recettori

tirosinchinasici TRKA, TRKB e TRKC. In recenti studi è stato riscontrato che elevati livelli di espressione di TRKC, recettore di NT3, correlano con un comportamento meno aggressivo del MB, probabilmente riconducibile alla capacità di questo recettore di mediare l'aumento di apoptosi. Questo effetto non è però fisiologico dell'attivazione di TRKC, che normalmente porta alla neurogenesi e alla maturazione delle cellule dei granuli nel cervelletto: probabilmente le cellule di MB incapaci di differenziarsi vengono pertanto spinte verso l'apoptosi [68]. Risulta rilevante anche il ruolo del recettore TRKA, fisiologicamente coinvolto nel differenziamento neuronale: l'attivazione *in vitro* della via di segnalazione NGF/TRKA, nonché studi di espressione *in vivo* dell'mRNA di TRKA, hanno dimostrato una significativa associazione tra i livelli di TRKA ed una prognosi favorevole nel MB. Quest'ultima sembra essere spiegata da una massiva apoptosi contestuale ad una diminuita crescita tumorale [69].

ALTERAZIONI EPIGENETICHE. L'epigenetica si sta affermando come un meccanismo centrale nella biologia del cancro. Gli eventi epigenetici sono definiti come “variazioni dell'espressione genica non dovute ad alterazioni della sequenza genetica”, e il loro marker più noto è la metilazione del DNA [70]. Le prime prove di un coinvolgimento dell'epigenetica nel cancro vennero dal riscontro di una globale ipometilazione nelle neoplasie [71], seguite dall'identificazione dell'ipermetilazione degli oncosoppressori [72,73] e più di recente dall'inattivazione dei miRNA per metilazione [74]. Due eventi epigenetici riconosciuti recentemente risultano importanti nella patogenesi del MB: la dimetilazione dell'istone H3 lisina 9 (H3K9met2) e la metilazione del promotore di PTCH1-1C.

H3K9met2 è una alterazione comune nella biologia dei tumori: l'espressione genica aberrante nei tumori è associata sempre più spesso a modificazioni post-traduzionali di istoni e altre proteine di DNA *binding*, tali da alterare le proprietà funzionali della

cromatina, tanto che è stata elaborata una teoria detta “*histone code*”, per spiegare come le combinazioni di modificazioni a questo livello entrassero nel gioco della regolazione della trascrizione genica [75]. Secondo tale ipotesi l’acetilazione di H3K9 e la metilazione di H3K4, H3K36 e H3K79 sono correlate con l’attivazione trascrizionale, mentre la metilazione di H3K9, H3K27 e H4K20 sono associate ad eterocromatina trascrizionalmente silente. Recenti avanzamenti hanno però messo in discussione il codice istonico, la trimetilazione di H3K9 (H3K9met3) per esempio, è stata riscontrata in un contesto di attivazione trascrizionale [76]. Il silenziamento comportato dalla presenza della dimetilazione di H3K9 è necessario per il differenziamento di diversi tessuti, incluse le cellule staminali embrionali. Nel MB, tramite uno studio ad alta risoluzione su 212 campioni di tumore primario, sono state messe in luce modificazioni ricorrenti che colpivano in modo specifico la metilazione dell’istone H3, lisina 9. In particolare, l’amplificazione dei geni *lysine (K)-specific demethylase 4C* (KDM4C alias JMJD2C) e *lysine (K)-specific demethylase 2B* (KDM4B alias JMJD2B), che codificano per due demetilasi lisina-specifiche, del gene *MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3* (MYST3) che codifica per una HAT lisina-specifica, e la delezione di *euchromatic histone-lysine N-methyltransferase* (EHMT1), che codifica per una metiltransferasi, comportavano l’ipometilazione al locus H3K9, con spegnimento dei geni di differenziamento nel tessuto e un aumento dell’aggressività tumorale. Coerentemente con questi dati, studi in vitro hanno dimostrato che la stessa perdita di metilazione comporta l’aumento della proliferazione cellulare in linee di MB umano [77].

L’ipermetilazione delle regioni dei promotori che frequentemente si riscontra nell’epigenomica dei tumori è stata messa in relazione con la repressione trascrizionale e si sta affermando come un passo precoce ed importante nella carcinogenesi [78]. Un’analisi

di metilazione *genome-wide* ha recentemente fornito un pannello di alterazioni comuni nei MB pediatrici, comprendendo modifiche nello stato di metilazione in *pathway* di regolazione dello sviluppo cruciali, quali SHH, WNT, il recettore dell'acido retinoico (RAR) e la *Bone Morphogenic Protein* (BMP). Uno dei *loci* più comunemente soggetti a metilazione è quello del promotore di PTCH1, in particolare dell'isoforma PTCH1-1C, recentemente messo in luce come regolatore negativo della via di SHH [79]. L'inattivazione epigenetica di PTCH1-1C comporta di conseguenza un aumento dell'aggressività del MB [80].

1.4 CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE

Man mano che diventavano disponibili dati provenienti da tecniche sempre più accurate (e.g. bandeggi, immunoistochimica, FISH, sequenziamento del singolo gene, Southern blot, etc.), diventavano sempre più numerose le differenze e le similitudini a livello molecolare tra i sottotipi tumorali. Più di recente tecnologie avanzate quali *Comparative Genomic Hybridization array* (aCGH), profili di espressione di mRNA e miRNA e piattaforme ad alta risoluzione per *single nucleotide polymorphism* (SNP) e *copy-number variation* (CNV) sono state impiegate insieme ad approfondite analisi di biostatistica per associare un profilo di determinanti molecolari ad un preciso sottogruppo di neoplasie.

Ogni tentativo di subclassificare il MB secondo criteri molecolari ha portato ad osservazioni che aprivano scenari ancora più grandi. Tuttora non vi è una classificazione molecolare definitiva, solo nell'ultimo anno due importanti lavori hanno diviso i casi rispettivamente in 4 e 6 categorie distinte [81].

I MB insorgenti sullo sfondo delle sindromi di Turcot di tipo 2 e di Gorlin fecero concentrare i primi studi molecolari sui sistemi di traduzione del segnale alterati in tali contesti, rispettivamente i *pathway* WNT e SHH [24,25], mentre successivamente molti altri sistemi molecolari vennero riconosciuti alterati [82].

Due studi d'espressione di prima generazione furono portati avanti dai gruppi di MacDonald e Pomeroy, rispettivamente nel 2001 e nel 2002. Il primo lavoro riguardò una casistica di 23 tumori primari divisi tra M0 e M+ (senza o con metastasi al momento della diagnosi), ed evidenziò che tra le due classi sussistevano alterazioni in 85 geni, in particolare appartenenti alla famiglia dei *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) e del *signalling RAS/MAPK* (maggiormente espressi nei tumori metastatici) [83]. Il secondo studio impiegò una piattaforma Affymetrix in grado di riconoscere circa 6000 geni, per comparare i profili di espressione in un set di 34 casi di MB, divisi tra istologia classica (25 casi) e desmoplastica (9 casi). In questo lavoro emersero i primi dati concreti che legavano l'istologia desmoplastica e il *pathway* SHH: i geni PTCH, GLI, MYCN e IGF2 risultarono sovraespressi nel MB desmoplastico [18].

Nel 2005, Mendrzyk e colleghi, tramite aCGH di 47 casi, riscontrarono l'amplificazione di MYC e MYCN, l'acquisizione del 17q e la sovraespressione di CDK6 positivamente correlati con l'istologia LC/A. Risultò inoltre una forte correlazione negativa tra questi fattori la sopravvivenza [84].

L'anno dopo Thompson e collaboratori analizzarono il profilo di 46 MB dividendoli, con *clustering unsupervised* in 5 gruppi. Tale raggruppamento contribuì a evidenziare le differenti origini dei MB desmoplastici con alterazione di SHH (mutazione PTCH e SUFU, delezione 9q) e quelli ad istologia classica con mutazioni attivanti di CTNNB1 e monosomia 6, inoltre correlò l'istologia anaplastica in un altro sottogruppo [85] (Figura 4).

Un seguente lavoro di Kool e colleghi del 2008 studiò una casistica di 52 MB, cercando una correlazione con alterazioni cromosomiche tramite aCGH. Anche in questo caso emersero 5 sottogruppi, solo parzialmente sovrapponibili allo studio di Thompson: un cluster A caratterizzato dall'attivazione WNT, dalla

monosomia 6 e dal *signalling* di TGF- β ; un cluster B con alterazione della via SHH, perdita del 9q e bassi livelli dell'oncogene OTX2. I successivi tre *clusters* (C, D, E) presentano differenze meno marcate e un certo grado di sovrapposizione: C e D mostrano un'elevata espressione di geni correlati al differenziamento neuronale, allo stesso tempo D ed E esprimono geni di fotorecettori [86] (Figura 4).

I due studi più recenti sono stati portati avanti da Northcott e Cho, con casistiche ampie, rispettivamente di 103 e 194 pazienti. Nel primo lavoro è stata analizzata sia l'espressione genica, sia le aberrazioni di *copy-number*, tramite analisi *unsupervised* multiple. E' stato quindi possibile identificare 4 sottogruppi demograficamente, clinicamente, geneticamente e trascrizionalmente distinti: gruppo WNT, gruppo SHH, gruppo C, gruppo D [87] (Figura 4). Il *cluster* associato a SHH mostra anche l'amplificazione del gene *Yes-associated protein* (YAP1), in accordo con il recente *report* sull'attivazione della via di segnalazione Hippo/YAP1 [88]. Il gruppo C è stato statisticamente correlato con il *pathway* di fototrasduzione e il *signalling* del recettore del glutammato. Il gruppo D è stato invece associato al *signalling* neuronale delle semaforine, alla via di segnalazione dell'AMP ciclico e dei recettori accoppiati alle proteine G. Come ulteriore validazione, il lavoro evidenzia in immunohistochimica *marker* specifici per ogni sottogruppo: β -catenina/DKK1 (gruppo WNT) (Figura 3a-b), SFRP1/GLI1 (gruppo SHH), NPR3 (gruppo C), KCNA1 (gruppo D) [87].

Lo studio di Cho coinvolge non solo un'accurata analisi d'espressione di mRNA, ma anche di miRNA e SNP. L'esito del lavoro è una divisione dei casi in 6 sottogruppi, inclusi la variante con WNT attivato (c6) e SHH alterato (c3) (Figura 4). Il gruppo c1 è identificato dall'amplificazione di MYC, oltre che da diversi *gains* di *copy-number*, e dall'espressione di geni associati a fotorecettori e *gamma aminobutyric acid A receptor alpha 5*

(GABRA5). Il gruppo c5 mostra sovrapposizione per quanto riguarda MYC, ma è principalmente caratterizzato dall'amplificazione di OTX2. Nei gruppi c2 e c4 è presente un forte grado di espressione di geni correlati alla differenziazione neuronale (c4 è però molto sovrapposto a c1). Il profilo di miRNA mostra una associazione di miR-183-96-182 (associati a geni per fotorecettori) con c2 e c5, miR-592 con c2 e c4, aumento di miR-199b miR-378 miR-28 miR-625 e diminuzione di miR-135a/b miR-338 miR-124 miR-138 in c3, e aumento di miR 23-27-24 in c6 [89]. Questi ultimi studi hanno inoltre evidenziato differenze demografiche, trovando un'associazione significativa del gruppo SHH con tumori insorgenti entro i 3 anni di vita, e un *trend* per cui le varianti esprimenti Wnt attivo e SHH alterato tendono a colpire individui di sesso femminile.

1.5 FATTORI PROGNOSTICI E STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO

CRITERI CLINICI. Diversi *trials* clinici hanno identificato tre importanti fattori prognostici e di stratificazione del rischio.

- Età del paziente alla diagnosi: nei bambini di età inferiore ai tre anni il rischio di una progressione sfavorevole della malattia, a cinque anni dalla diagnosi, è due volte maggiore rispetto a bambini di età superiore. A questo concorrono tanto le caratteristiche del tumore quanto quelle della terapia in questa particolare fascia d'età. Come precedentemente accennato, l'evoluzione neoplastica, in questi pazienti, ha un andamento più aggressivo. Peraltro l'età impone importanti restrizioni terapeutiche in quanto la tossicità della RT è troppo elevata; il trattamento pertanto prevede unicamente asportazione chirurgica e chemioterapia.

-Estensione dei residui neoplastici post-operatori: la presenza di residui della lesione tumorale superiori a 1,5 cm² è indice di una

prognosi sfavorevole; viceversa residui post-operatori minori sono associati a prognosi più favorevole.

-Presenza di metastasi: la presenza di metastasi a livello neurale o extra-neurale, al momento della diagnosi, è associata a prognosi negativa [9].

Su questi criteri poggia la classificazione attualmente condivisa negli USA secondo la quale si distinguono tipicamente due gruppi di pazienti:

- nel primo gruppo rientrano i pazienti con un moderato rischio in cui la diagnosi viene effettuata dopo il terzo anno d'età, con una resezione totale della massa tumorale o minimi residui post-operatori, assenza di metastasi ed un'alta percentuale di sopravvivenza a 5 anni (70 -75%);

- nel secondo gruppo sono inclusi pazienti ad alto rischio, di età media inferiore ai 3 anni, con una resezione parziale del tumore o evidenze di residui post-operatoti importanti, presenza di metastasi ed una sopravvivenza a 5 anni drasticamente ridotta (30 - 40%).

In Europa i criteri utilizzati per distinguere le diverse categorie di rischio sono l'età del paziente, la stadiazione del tumore secondo i criteri di Chang ovvero la dimensione/localizzazione del tumore (stadio T) e la presenza di metastasi (stadio M) [9,90].

Sebbene la stratificazione del rischio attualmente si basi su questi parametri clinici, è ormai riconosciuto che caratteristiche istopatologiche e molecolari/genetiche possano essere altamente predittive del comportamento biologico e della risposta alle terapie del MB. La stratificazione del rischio infatti, così 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 i soggetti ad alto rischio che ricevono trattamenti eccedenti le loro reali necessità [9]. Come i

risultati di alcuni studi hanno evidenziato una stratificazione del rischio che utilizzi la combinazione di parametri clinici e marker istopatologici, molecolari e genetici ha invece la potenzialità di discriminare tra pazienti con tumori biologicamente più aggressivi, per i quali sono opportuni terapia massimale o trattamenti sperimentali, e pazienti con tumori meno aggressivi, che possono essere invece curati con terapie leggermente più blande in modo da limitare gli effetti collaterali ad esse associati [18,91,92].

ISTOPATOLOGIA. La prognosi del MB dipende largamente dal quadro istocitopatologico e sembra essere correlata positivamente con il grado di differenziazione delle cellule neoplastiche: la variante desmoplastica è spesso associata ad una prognosi più favorevole, mentre quella a grandi cellule è associata ad una prognosi estremamente severa, poiché vi è disseminazione precoce delle cellule tumorali nonostante la terapia. Recentemente è stato dimostrato che il MB ad estesa nodularità ha in genere un decorso clinico positivo e tanto più il grado di nodularità è esteso ed è marcata la differenziazione in senso neuronale delle cellule intranodulari tanto più la prognosi migliora [4].

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 [12,14,91]. Giangaspero e collaboratori hanno 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 [91]. 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 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 e collaboratori per i quali invece la maggior parte dei casi (70%) non mostra o mostra solo lievemente segni di anaplasia [3]. 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 ed 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 [91].

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 [93], per altri è associata a prognosi negativa [94], secondo altri ancora non ha alcun valore prognostico [95]. Ad ogni modo, la suddivisione dei casi in tre categorie di apoptosi (focale, diffusa ed estensiva) produce un'associazione con la sopravvivenza, che vede i MB con apoptosi focale mostrare una prognosi migliore rispetto alle altre due categorie [91]. Il quadro generale è ulteriormente confuso dagli studi sui marcatori che hanno un ruolo fondamentale nella regolazione dell'apoptosi. Sebbene BCL2 prevenga la morte cellulare programmata indotta dalle RI, i MB immunopositivi per BCL2 non recidivano prima di quelli che non lo esprimono [96].

MARKER CITOGENETICI E MOLECOLARI. Sebbene non ancora entrati nella pratica clinica, sono stati individuati e proposti allo scopo di perfezionare la stratificazione del rischio singoli marcatori genetici e molecolari che hanno mostrato avere una significatività prognostica attraverso le diverse varianti cliniche e patologiche

[20,21]. La perdita del 17p o l'acquisizione del 17q, indipendentemente dal gruppo di rischio, si configura come fattore prognostico negativo, associato a bassi *Overall Survival* (OS) e *Event-Free Survival* (EFS), sebbene sia ancora da definire la causa per cui questa alterazione abbia un effetto negativo sull'*outcome* dei pazienti ed i geni coinvolti in tale risposta [36]. Anche l'acquisizione di 1q e di 8q (regione minima 8q23-q24) correla con un esito negativo: una copia aggiuntiva del braccio lungo del cromosoma 1 (1q) sembra conferire maggiore aggressività al tumore, sebbene il meccanismo sotteso sia ancora da chiarire. Altre alterazioni riscontrate sono l'acquisizione di un *locus* del cromosoma 7 che contiene l'oncogene CDK6, marker di prognosi positiva anche nel glioblastoma e nell'astrocitoma anaplastico. Al contrario, la delezione di 9q sembra essere invece correlata ad un aumento della sopravvivenza (sia OS che EFS), come anche la perdita del cromosoma 6 è correlata ad una prognosi favorevole del tumore [35,36].

Tra i principali *marker* molecolari identificati si annoverano l'amplificazione e l'iperespressione dell'oncogene MYC e/o MYCN, l'iperespressione del recettore ERBB2 e di MET associati a prognosi negativa. L'amplificazione di MYC correla con una prognosi infausta; in alcuni pazienti si ritrova un'iperespressione dell'mRNA di MYC, in assenza di amplificazione dell'oncogene, anch'essa legata ad un'evoluzione sfavorevole della malattia [23,40,53,57]. Gli elevati livelli di espressione di TRKA, TRKC, NFG, nonché la nucleo-positività per β -catenina sono invece associati a prognosi favorevole nel MB umano [68,69,91].

Va ricordato inoltre un interessante studio incentrato sull'instabilità microsatellitare nel MB. Dall'analisi, condotta su 36 MB, si evince che essa ha un'incidenza piuttosto bassa, ovvero dell'11%, e sembra non essere età-correlata. Questo suggerisce l'esistenza di un nuovo sottogruppo molecolare di MB, associati ad instabilità

microsatellitare, di cui va approfondito il ruolo nella carcinogenesi e la valenza come marker prognostico [97].

NUCLEOPOSITIVITÀ PER B-CATENINA. Da uno studio traslazionale 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 (Figura 3a-b), indicativa di attivazione del sistema WNT, e prognosi favorevole (Figura 5). Inoltre, bambini con metastasi alla diagnosi o MB a grandi cellule che presentino nucleopositività per β -catenina non hanno una prognosi così negativa come quella attesa. Ciò stupisce visto il ruolo di β -catenina nel promuovere la proliferazione nonché la crescita in alcune neoplasie come l'epatocarcinoma, il tumore colon-rettale o il carcinoma polmonare [92]. L'attivazione del WNT presenta infatti funzioni tessuto/tumore specifiche: in alcuni sistemi come i fibroblasti embrionali murini, β -catenina nucleare stimola la proliferazione cellulare, l'evasione dall'apoptosi, la staminalità, l'invasione e la metastasi. Al contrario, ci sono popolazioni cellulari (le cellule immature dell'EGL), in cui β -catenina induce l'apoptosi. Il sistema WNT, in aggiunta al suo ruolo fisiologico nell'embriogenesi e nel mantenimento dell'omeostasi, è implicato nella patogenesi di molte neoplasie umane, ma il suo ruolo risulta appunto controverso, in quanto β -catenina nucleare è associata a prognosi negativa nel cancro del colon-retto e nei gliomi ad alto grado o a prognosi positiva nel coriocarcinoma, nel retinoblastoma e nel MB. Studi su topi transgenici hanno inoltre dimostrato che l'espressione di una forma mutata e non degradabile di β -catenina, in cellule neuronali mature, non comporta sviluppo di tumori, suggerendo che l'attivazione aberrante del *pathway* WNT, in cellule ben differenziate, non sia uno stimolo sufficiente per la tumorigenesi [98]. Ellison DW e collaboratori hanno proposto una spiegazione dell'attivazione del sistema WNT contestuale, nel MB, alla nucleopositività per β -catenina: esso giocherebbe un ruolo critico

nel bilancio tra proliferazione e morte cellulare generando cloni di cellule neoplastiche predisposte all'apoptosi e/o estremamente radiosensibili o selezionando un fenotipo meno aggressivo del tumore [92]. Inoltre altri dati hanno corroborato quest'ipotesi affiancando all'analisi di mutazioni attivanti in *catenin beta 1* (CTNNB1), gene che codifica per β -catenina, e la sua nucleopositività, lo studio dell'iperespressione di *cyclin D1* (CCND1), uno dei geni *target* del sistema WNT. L'evidenza di una sopravvivenza totale maggiore nei casi di MB con sovraregolazione di CCND1, concomitante all'attivazione di WNT, avvalorava l'associazione tra attivazione di WNT e prognosi favorevole [99]. Inoltre la perdita del cromosoma 6, associata ad *outcome* positivo nel MB, è solitamente rilevata nei MB con sistema WNT attivo (Figura 4). A supporto dell'ipotesi che tra perdita del cromosoma 6 e attivazione di WNT vi sia una stretta associazione, c'è l'osservazione che, casi di MB in cui il sistema WNT è inattivo, solitamente legati ad una prognosi negativa, sono caratterizzati da altre anomalie cromosomiche, quali perdita del cromosoma 17p, 8, 10 e 16 o acquisizione del cromosoma 17q e 7 [35].

La pregnanza del sistema WNT nella tumorigenesi, in particolare nel MB, emerge anche da studi su modelli murini di MB WNT-indotti: in topi transgenici TP53^{-/-}, le cellule cerebrali (in particolare cellule esprimenti GFAP) sono state trasfettate con una forma mutata, e quindi stabilizzata, di β -catenina (β -catenina S37A) e con una *wild-type* di MYC. Mediante questo modello sperimentale è stato possibile indagare il contributo reciproco dato all'oncogenesi dalla perdita di TP53, dall'iperespressione di MYC e dalla deregolazione di β -catenina. Si è visto che l'iniezione cerebrale di cellule trasfettate solo con β -catenina stabilizzata non comportava lo sviluppo di tumori cerebrali, mentre la trasfezione solo con MYC determinava la comparsa di MB, per lo più assimilabili alla variante a grandi cellule/anaplastica. La combinazione dei due, ovvero l'iniezione di cellule trasfettate sia

con β -catenina mutata che con MYC, dava origine a tumori caratterizzati da un'incidenza confrontabile ai precedenti, ma meno invasivi e con minore tendenza metastatizzare rispetto a quelli indotti esclusivamente da MYC, ad indicare che β -catenina espleta il suo ruolo non durante l'iniziazione ma nella progressione tumorale [100].

Stratificazione del rischio su base molecolare. Una stratificazione efficace non solo permetterebbe la suddivisione precoce dei pazienti nell'adeguata terapia, ma renderebbe possibile intervenire con farmaci mirati verso un *pathway* specifico (e.g. WNT, SHH). La proposta più valida viene da due studi di David Ellison e colleghi, che prevedono la definizione, oltre al protocollo di rischio standard, uno per i pazienti a basso rischio (sottogruppo molecolare con WNT attivo) e uno per i pazienti ad alto rischio (M+, fenotipo LC/A e amplificazione di MYC) (Figura 6). I MB con WNT attivato sono molto ben caratterizzati e distinti dagli altri sottogruppi: si presentano per lo più nel bambino in età pre-adolescenziale e hanno un'istogenesi unica; inoltre rispondono ottimamente al regime terapeutico attuale, con un tasso di sopravvivenza molto alto. Stratificare questi tumori in un protocollo a basso rischio, con terapia adiuvante ridotta, vorrebbe dire migliorare sensibilmente gli effetti avversi a lungo termine mantenendo al contempo un'alta efficacia terapeutica (Figura 7). I MB con WNT attivo sono facilmente identificabili in immunohistochimica dalla reattività nucleare per β -catenina (Figura 3a-b). Tale test si presenta ideale sia sotto il profilo clinico, sia a livello laboratoristico. Al contrario, le mutazioni nella via di segnalazione di SHH risultano un fattore avverso, che comportano un aumento del grado di rischio della malattia [101].

1.6 TERAPIA

PROTOCOLLI TERAPEUTICI. Il trattamento convenzionale del MB attualmente prevede la combinazione di chirurgia con RT e

chemioterapia adiuvante; il “*gold standard*” della terapia è rappresentato dall’asportazione chirurgica, totale o parziale, del tumore primitivo, generalmente seguita da cicli di RT dell’intero neurasse. Essendo il MB un tumore estremamente radiosensibile, tipicamente lo standard attuale negli USA prevede RT post-operatoria cranio-spinale data la tendenza del tumore a metastatizzare attraverso il CSF, concomitante all’irradiazione della fossa posteriore: i soggetti a medio rischio richiedono RT cranio-spinale post-operatoria frazionata per un totale di 23.4 Gy, seguita da una dose totale di 54 Gy a livello della fossa posteriore e 12 mesi di chemioterapia; per i soggetti ad alto rischio si ricorre ad una dose di irradiazione di 36 Gy a livello cranio-spinale e di 54 Gy a livello della fossa posteriore, seguite da chemioterapia [14]. 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 [15].

FRAZIONAMENTO DELLE RI. La dose di RI che può essere effettivamente impiegata nella singola seduta di trattamento del paziente è vincolata dalla necessità di limitare i danni ai tessuti sani circostanti il tumore. Generalmente in clinica si utilizzano frazioni multiple di 100-300 cGy, erogate a livello della sede tumorale, che eccedono ampiamente la dose letale qualora fosse irradiato il corpo intero o larga parte di esso (irradiazione globale o *total body*). Il frazionamento dell’irradiazione, dilazionata in un certo intervallo di tempo, ha significativamente aumentato l’effetto antitumorale rispetto alla singola applicazione, consentendo di raggiungere dosi cumulative più elevate e limitando i danni ai tessuti sani rispetto ad un’unica dose elevata.

Malgrado questi accorgimenti, atti a minimizzare l'esposizione delle cellule normali, è impossibile risparmiarle completamente poiché è necessario irradiare anche l'area circostante il tumore, data la natura invasiva che ne caratterizza la crescita. Queste considerazioni rendono ragione della criticità del trattamento del MB che, in virtù della sua localizzazione e del tipo di pazienti, comporta significativi effetti secondari [14].

CHEMIOTERAPIA. I chemioterapici generalmente utilizzati sono: agenti alchilanti, composti del platino, come lomustina, ciclofosfamide e cisplatino nonché vincristina. In pazienti a medio rischio, alla RT è generalmente associata una chemioterapia adiuvante con lomustina, vincristina e cisplatino. In pazienti ad alto rischio il principale obiettivo è quello di aumentare la sopravvivenza; i migliori risultati in tal senso si ottengono combinando la resezione chirurgica e RT con una chemioterapia con ciclofosfamide, vincristina e cisplatino. Sono stati condotti *trials* clinici per comparare l'efficacia della chemioterapia pre-radioterapica rispetto ad una post-radioterapica. Quest'ultima ha mostrato un aumento del 13% della sopravvivenza libera da malattia a 5 anni (*Progression-Free-Survival*, PFS). Analogamente alla RT anche la chemioterapia, in virtù della tossicità degli agenti utilizzati, comporta notevoli danni a carico del SNC [9].

EFFETTI COLLATERALI. Il protocollo terapeutico previsto per il MB, pertanto, se da un lato previene la disseminazione cerebrale e spinale del tumore, dall'altro implica importanti sequele neurocognitive ed endocrine a lungo termine: *deficit* intellettivi e ritardi mentali, quantificabili in termini di diminuzioni del QI, carenze ormonali con conseguente compromissione dello sviluppo, soprattutto nelle donne, perdita dell'udito, danni cerebro-vascolari e tumori secondari all'esposizione a RI [2,102,103].

L'asportazione chirurgica può comportare complicanze quali la sindrome da mutismo cerebellare (CMS) caratterizzata da

mutismo, ipotonia, atassia, instabilità emotiva nonché disfunzioni cerebrali, disfagia e paralisi abducente.

Da un'analisi sistematica, recentemente condotta, sulla tossicità a lungo termine degli attuali trattamenti terapeutici, della RT in particolare, si evince che molteplici siano gli aspetti potenzialmente coinvolti: le sequele endocrinologiche sono principalmente, ma non esclusivamente, riconducibili al danno diretto delle radiazioni sull'ipofisi e sull'ipotalamo, cui consegue ipotiroidismo, riscontrabile dall'8% al 60% dei casi, e meno frequentemente diminuzione dei livelli di ACTH e GSH. *Deficit* nell'accrescimento e nell'allungamento delle ossa ovvero osteopenia ascrivibili principalmente agli effetti della RT sono pubertà precoce, *deficit* di GH e alterazioni dell'accrescimento spinale. La RT induce uno stress ossidativo tale da danneggiare neuroni, oligodendrociti e cellule endoteliali. Le conseguenze neurocognitive a lungo termine pregiudicano l'intera vita dei pazienti ovvero la possibilità di avere un'istruzione, lavorare, formare una famiglia poiché questi soggetti presentano *deficit* in QI, memoria, attenzione, linguaggio, abilità matematiche e alterazioni del ritmo sonno-veglia. L'ototossicità ovvero *SensoriNeural Hearing Loss* (SNHL) è uno degli effetti secondari maggiormente documentati e sembra essere determinata dalla chemioterapia, per lo più con cisplatino, e dagli effetti della RT sulla coclea. La RT e gli agenti alchilanti comportano anche tossicità ginecologica ovvero danni alle ovaie, alterazione della maturazione dei follicoli, riduzione del 20% della fertilità e menopausa precoce, nonché compromissione della salute del feto con parti prematuri e neonati di basso peso alla nascita. E' legato a chemioterapia ma soprattutto a RT l'aumento del rischio di neoplasie secondarie quali meningioma, astrocitoma, glioblastoma, fibrosarcoma, adenocarcinoma rettale, leucemia linfoblastica acuta e leiomiomasarcoma ovarico. Infine si riscontrano tossicità

cardiaca, polmonare, in particolare *Restrictive Lung Disease* (RLD), ematologica nonché alopecia e iperpigmentazione [104]

OTTIMIZZAZIONE DELLA RT. Malgrado la sopravvivenza libera da malattia a 5 anni sia tra il 40% e il 55% per i soggetti ad alto rischio e tra il 70% e l'80% per quelli a basso rischio, è necessario ottimizzare i trattamenti per raggiungere il giusto equilibrio tra morbilità/mortalità del MB e tossicità della terapia [2]. In prospettiva di una RT adeguata al rischio effettivo un approccio innovativo potrebbe consistere nell'utilizzare *marker* molecolari per discriminare i pazienti con MB con prognosi più favorevole e più responsivi alle RI e trattabili quindi con una dose di irradiazione cranio-spinale (CSI) più bassa [105]. Una valida alternativa terapeutica sembra essere la "protone-terapia", un tipo di RT che sfrutta le caratteristiche fisiche dei protoni, ovvero il ristretto margine d'azione e la capacità di rilasciare energia solo alla fine del loro percorso nella materia; in virtù di questo, tale metodica sembra essere particolarmente promettente poiché permetterebbe di ridurre la tossicità a carico dei tessuti sani circostanti il tumore [104].

ALTERNATIVE TERAPEUTICHE. Una promettente alternativa terapeutica sembra essere la chemioterapia mieloablativa che prevede il recupero di cellule staminali autologhe (*autologous stem cell rescue*, ASCR) del paziente trattato, in particolare cellule del sangue periferico [11]. Il trattamento è ben tollerato e i risultati in termini di sopravvivenza sono soddisfacenti a breve termine, sebbene rimanga da chiarire l'efficacia a lungo termine. Anche la somministrazione di metotrexate, via intratecale o endovenosa, sembra essere utilizzata con successo in pazienti ad alto rischio. Si stanno sviluppando inoltre protocolli terapeutici specifici per bambini d'età inferiore ai tre anni, per i quali il trattamento rimane ancora una questione piuttosto critica; è noto infatti che, in tali soggetti, la terapia induca una maggiore tossicità e il tumore si presenta più aggressivo e con una maggiore tendenza alla

disseminazione; l'orientamento è pertanto quello di ridurre o evitare la RT, mantenendo però inalterata l'efficacia del trattamento, mediante resezione chirurgica associata ad una chemioterapia d'induzione seguita da una di mantenimento con cisplatino, vincristina, ciclofosfamide e ASCR [9].

STRATEGIE TERAPEUTICHE SU RAZIONALE MOLECOLARE. La necessità di utilizzare strategie differenti non è però dovuta unicamente alla tossicità correlata alla RT e alla chemioterapia, ma anche alla radioresistenza intrinseca che si riscontra in un terzo dei pazienti. Sebbene il MB sia considerato un tumore radiosensibile, numerosi fattori sono ritenuti importanti nel determinare un aumento dei fenomeni proliferativi e/o di radioresistenza oltre alla sopravvivenza e al rinnovamento di un comparto di cellule staminali; tra questi cruciale è l'elevata attività di alcuni *pathways*, i cui elementi possono essere iperespressi, mutati o amplificati. E' questo il motivo per cui le diverse vie di segnalazione (WNT, SHH, NOTCH, ERBB) coinvolte nello sviluppo del MB, potrebbero verosimilmente rappresentare un *target* terapeutico innovativo che associ alle terapie convenzionali una combinazione di inibitori ed induttori dei diversi sistemi molecolari implicati [106]. In un recente lavoro, sono stati studiati gli effetti del litio, farmaco che inibisce GSK-3 β e pertanto attiva il sistema WNT, su due linee cellulari di MB umano (D283MED e DAOY). Da questo studio emerge che il litio esercita un ruolo anti-neoplastico nel MB, inibendo la proliferazione cellulare, inducendo un blocco del ciclo cellulare in fase S e aumentando il tasso di mortalità non-apoptotica. Sebbene gli effetti del litio non siano strettamente riconducibili all'attivazione del sistema WNT, ma più all'inibizione di GSK-3 β , e la risposta alle dosi cliniche sia limitata dal contesto molecolare del tumore, questo lavoro offre un buono spunto per studi futuri sull'effetto del litio in combinazione alle terapie convenzionali nel MB e sullo studio di nuovi farmaci che abbiano come bersaglio specifico componenti del *pathway* WNT [107].

2. IL PATHWAY WNT

2.1 GENERALITÀ

RUOLO FUNZIONALE. Il sistema WNT riveste un ruolo essenziale nello sviluppo embrionale di molti organi, tra cui il SNC, in diversi organismi animali (ad esempio *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, *Caenorabditis elegans*, *Mus musculus*) poiché regola il differenziamento, la migrazione e la polarità cellulare [42,66]. Studi sul topo mostrano come le proteine WNT fungano da mitogeni per le cellule del SNC e da fattori di segnalazione per la formazione di arti, reni e apparato riproduttivo femminile. Oltretutto nell'adulto il *pathway* WNT permette il mantenimento dell'omeostasi tissutale a livello di cute, epitelio intestinale e sistema emopoietico [67]. Dato questo ruolo pregnante, si spiega come la deregolazione del sistema WNT possa compromettere seriamente lo sviluppo embrionale e concorrere, in maniera significativa, all'oncogenesi umana [108].

LE PROTEINE WNT. Numerosi sono i geni che codificano per proteine appartenenti alla famiglia WNT; fino ad ora nell'uomo ne sono stati identificati 19, la cui struttura è molto simile: infatti la maggior parte di essi comprende 4 esoni codificanti di cui il primo contiene una metionina iniziale. E' nota la localizzazione cromosomica e molti di essi sono organizzati in *cluster* di due geni vicini sul cromosoma, verosimilmente generati, durante l'evoluzione, per duplicazione di uno o pochi geni ancestrali e/o per eventi di traslocazione genica [109]. Le proteine WNT hanno una dimensione che va da 39 a 46 kDA e, una volta secrete, si associano strettamente a glicosaminoglicani della matrice extracellulare e si legano a recettori specifici sulla superficie cellulare [110]. Tuttavia ancora non è chiaro se agiscono come

monomeri o come complessi multiproteici. L'estremità carbossi-terminale conferisce specificità di risposta, mentre, la porzione amino terminale, è deputata al legame con il recettore di membrana, ma necessita comunque della parte carbossi-terminale per la sua attivazione [111].

2.2 IL SISTEMA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Il pathway WNT viene attivato attraverso il legame delle proteine WNT ai recettori *Frizzled homolog* (FZD), sulla superficie cellulare, i quali presentano un dominio extracellulare N-terminale ricco in cisteine (*cystein-rich domain*, CRD) responsabile del legame con il ligando, sette eliche transmembrana e una corta coda citoplasmatica carbossi-terminale. Per l'attivazione del sistema è necessaria la presenza anche dei corecettori *Low Density Lipoprotein-related protein 5* e *6* (LRP5 e LRP6) con formazione del complesso ternario WNT/FZD/LRP [111].

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". Il più studiato è la via di segnalazione canonica "WNT/ β -catenina" (Figura 8), la cui funzione principale è quella di regolare i livelli intracellulari di β -catenina [112].

LA VIA CANONICA WNT/B-CATENINA. In assenza di segnalazione WNT, β -catenina è rapidamente marcata per la degradazione dal complesso multiproteico APC/Axina/GSK-3 β . In tale complesso APC e Axina costituiscono uno *scaffold* proteico sul quale poggiano GSK-3 β e β -catenina, che facilita 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 dal complesso *SKP1*, *Cullina*, *F-box* (SCF)/ β -*transducin repeat containing protein* (β -TrCP), quindi poliubiquitinata e avviata alla

degradazione proteasomica [113]. In presenza delle proteine WNT, i recettori FZD e LRP sono attivati e causano due eventi concomitanti: da un lato Axina si lega al dominio citoplasmatico di LRP, fosforilato in Ser/Thr da *casein kinase I gamma* (CKI γ) e da GSK3 β , ed è sequestrata alla membrana plasmatica, dove viene inattivata e/o indirizzata alla degradazione [112]; dall'altro lato, è indotta la fosforilazione di *Dishevelled* (DVL alias DSH), 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 Axina e determina il rilascio di APC e l'inattivazione di GSK-3 β . Pertanto si ha un aumento di β -catenina citoplasmatica non fosforilata che, quindi, sfugge alla degradazione e trasloca al nucleo dove funge da *trans-attivatore trascrizionale* dei suoi geni *target*, complessandosi ai fattori di trascrizione TCF/LEF. Il meccanismo del trasporto nucleare di β -catenina non è chiaro: essa infatti non possiede un classico segnale di localizzazione nucleare (NLS), ma può legarsi direttamente al complesso del poro in assenza di altri fattori conosciuti, con meccanismo simile a quello dell'Importina- β [114]; inoltre si pensa che APC probabilmente partecipi al processo di trasporto, che potrebbe richiedere peraltro proteine come *B-cell CLL/lymphoma 9* (BCL9) e *Pygopus* (PYGO). In *Drosophila*, la proteina *Legless*, omologa di BCL9, lega infatti la proteina omologa di β -catenina, l'*Armadillo Protein Repeats* (ARM), trasportandola nel nucleo [114,115].

Nel nucleo β -catenina interagisce con fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia TCF/LEF, che include TCF1, LEF1, TCF3 e TCF4, per promuovere la trascrizione dei geni bersaglio. Alcuni sono geni importanti per la progressione del ciclo cellulare, come ad esempio MYC, CCND1 e gastrina, altri sono invece inibitori dell'apoptosi, come survivina, oppure geni promuoventi la progressione tumorale, come laminina- γ 2, e *matrix metalloproteinase 7* (MMP7), che codificano per proteine coinvolte

nella degradazione della membrana basale e della matrice extracellulare [111,112]. In assenza dell'attivazione del sistema WNT, il repressore *Transducin-like enhancer of split* (TLE), omologo di *Groucho* della *Drosophila*, inibisce la trascrizione, cooperando con le istone deacetilasi (HDACs), per formare un complesso in cui la struttura della cromatina è mantenuta inattiva; alla repressione dei geni *target* di WNT concorre anche *C-terminal binding protein* (CTBP) [116,117]. In questo scenario, il complesso β -catenina/TCF/LEF funge da attivatore trascrizionale poiché è in grado di competere con i repressori e formare un complesso d'attivazione che occupa le sequenze *WNT responsive elements* (WREs). A questo livello β -catenina recluta un macchinario co-attivante che è coinvolto nel rimodellamento della cromatina e nel controllo della RNA polimerasi II, eventi necessari per indurre l'espressione dei geni WNT-specifici [118].

IL CROSSTALK TRA SISTEMA WNT E P53-ARF. Particolarmente interessante è il *crosstalk* tra β -catenina e p53: è stato infatti osservato che β -catenina deregolata è in grado di indurre p53 [119] e che questa induzione è strettamente dipendente dalla proteina CDKN2A, prodotto di un altro importante oncosoppressore [120,121]. 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 [121,122]. 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. L'abilità di p53 di "orchestrare" la risposta a questo tipo stimolazione, inducendo l'apoptosi o bloccando la proliferazione cellulare, è indice della sua importanza come oncosoppressore [120].

WNT E APOPTOSI. Un secondo ruolo di ARF è però quello di indurre l'apoptosi p53-indipendente, mediante l'induzione della

degradazione della proteina *C-Terminal Binding Protein* (CtBP), l'inibizione di MYC e l'interazione con altre proteine ancora da identificare. E' quindi ipotizzabile che, in alcune situazioni specifiche come nel MB, β -catenina deregolata non rappresenti un *marker* tumorigenico ma, al contrario, possa indurre apoptosi p53-indipendente [108]. D'altro canto, in fibroblasti di topo, l'attivazione di p53 da parte di β -catenina deregolata non sembra indurre apoptosi, piuttosto porta ad arresto della crescita simile a senescenza [64]. Ciò può essere spiegato ammettendo che β -catenina, tramite *WNT1 inducible signalling pathway protein* (WISP1), abbia azione anti-apoptotica, lasciando intatta unicamente la funzione di inibitore della crescita di p53: β -catenina infatti induce fortemente l'espressione del gene WISP1, il cui prodotto può effettivamente bloccare l'apoptosi p53-mediata. Inoltre la proteina WISP1, sovraregolata dal *signaling* WNT/ β -catenina, ha un ulteriore effetto anti-apoptotico correlato all'attivazione della chinasi AKT [123].

E' emerso che esista una reciproca regolazione tra p53 e β -catenina: non solo p53 è modulata dai livelli di β -catenina, ma 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 , un'altra mediata dal complesso PKA/Presenilina/GSK-3 β ed infine una, mediata da *seven in absentia homolog 1* (SIAH1), che non coinvolge GSK-3 β [124-126]. Un ulteriore meccanismo, attraverso il quale p53 potrebbe portare alla diminuzione dei livelli di β -catenina, è rappresentato dall'attivazione p53-mediata della trascrizione genica dell'inibitore *dickkopf homolog 1* (DKK1) [31].

2.3 B-CATENINA

SEQUENZA GENICA. β -catenina così denominata dal gene che la codifica (CTNNB1) è il principale membro della famiglia delle ARM, inizialmente identificato in *Drosophila* e definita appunto Armadillo. Il gene mappa nella regione cromosomica 3p22-p21.3, è lungo 23,2 Kb ed è composto da 16 esoni. Tra il primo esone e il primo introne si trovano importanti elementi regolatori, una TATA Box e un'isola CpG. La presenza di isole CpG è una caratteristica dei promotori ed è possibile che l'espressione della proteina sia down-regolata in questa regione attraverso il meccanismo della metilazione. Vi sono poi altre regioni del gene che presentano sequenze di legame per diversi fattori di trascrizione come *Sp1 transcription factor* (SP1), *jun proto-oncogene* (JUN alias AP1), *transcription factor AP-2 alpha* (AP2) e *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1* (NF-KB) e sequenze consenso per *Early Growth Response 1* (EGR1) e *Wilms Tumor Zinc Finger* (WT-ZF) [127].

STRUTTURA PROTEICA. Strutturalmente la proteina è formata da un dominio centrale costituito da ripetizioni in tandem di 42 aminoacidi chiamate "armadillo-like repeats" (R1-12) comprese tra le due estremità amino e carbossi terminali. Le dodici ripetizioni ARM formano una struttura a superelica che genera un ampio solco carico positivamente. E' questa la zona in cui β -catenina prende contatto con i suoi ligandi, che risultano di carica negativa, come ad esempio alcuni fattori di trascrizione, alcune caderine o proteine del complesso di degradazione. La regolazione dell'interazione tra β -catenina e i suoi ligandi sembra avvenga attraverso la fosforilazione di entrambi [128]. La proteina possiede due regioni di attivazione: la prima N-terminale, *N-terminal Activating Arm* (NTAA), alla quale si legano i fattori BCL9, PYGO, Reptina e Pontina; la seconda C-terminale, *C-terminal Activating Arm* (CTAA), a cui si legano *SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily a*

member 4 (SMARCA4 alias BRG1), EP300, transformation/transcription domain-associated protein (TRRAP), Mediator complex subunit 12 (MED12) e polymerase-associated factor 1 (PFA1) del complesso Hyrax HYX (/Parafibromina. La regione compresa tra R10 e la regione carbossi-terminale sembra essere responsabile dell'importazione nucleare di β -catenina, mentre la regione R3-R10 costituisce il core d'interazione con TCF [116,118]. Non è ancora stato completamente chiarito in che modo la proteina sia indirizzata verso un complesso piuttosto che un altro: si potrebbe trattare semplicemente di competizione tra i diversi ligandi.; alternativamente è stata ipotizzata l'esistenza di differenti forme di β -catenina con diverse affinità di legame [115].

LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE. β -catenina esiste in tre pool a localizzazione e funzione diverse:

- β -catenina legata all'E-caderina a livello della membrana plasmatica;
- β -catenina nucleare complessata a fattori di trascrizione della famiglia TCF/LEF che promuove la trascrizione dei geni bersaglio;
- β -catenina legata al complesso APC/Axina/GSK-3 β , che la indirizza alla degradazione [113].

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 [129,130].

2.4 WNT E ONCOGENESI

Il sistema WNT oltre ad avere un importante ruolo nello sviluppo embrionale, ha un notevole potenziale tumorigenico, quest'ultimo ascrivibile non tanto a mutazioni o espressione aberrante dei geni WNT quanto a mutazioni in componenti del *pathway* WNT/ β -catenina. Verosimilmente la capacità oncogenica di queste alterazioni è insita in un'attivazione incontrollata del sistema WNT con conseguente iperespressione dei geni bersaglio [108]. Inoltre, durante lo sviluppo dei carcinomi, le cellule subiscono una transizione epitelio-mesenchima, in cui i complessi E-caderina/ β -catenina/ α -actina si dissociano, e si ha perdita delle giunzioni aderenti e una maggiore tendenza a metastatizzare [131].

MUTAZIONI DI B-CATENINA. La maggior parte delle mutazioni è a carico del gene CTNNB1. Da diversi studi è emerso che le mutazioni di CTNNB1, per lo più identificate nei MB sporadici, aboliscano i siti in cui β -catenina viene fosforilata da GSK-3 β e quindi marcata per la degradazione; si tratta di mutazioni missenso a livello di sequenze, contenute nell'esone 3 del gene CTNNB1, codificanti per tre serine e una treonina, separate tra loro da tre residui differenti. In particolare da un ampio studio sullo *status* di β -catenina nei tumori cerebrali pediatrici è emerso che i residui *target* generalmente implicati sono rappresentati dalle serine del codone 33, convertite in cisteine. Sono stati identificati siti mutazionali aggiuntivi: a livello del codone 32, in cui l'aspartato è convertito in tirosina; del codone 34, in cui la glicina è convertita in acido glutamico; e dei codoni 37 e 40, con conversione della treonina in serina [57]. Queste modificazioni portano alla formazione di proteine mutanti che si comportano come dominanti negativi e, impedendo la degradazione fosforilazione-dipendente di β -catenina, ne determinano un aumento incontrollato tale da indurre un fenotipo trasformante [2]. Mutazioni di β -catenina sono state riscontrate in circa il 4,5% dei

casi di MB sporadico, sia classico che desmoplastico, il che indica che l'alterazione del segnale WNT potrebbe essere coinvolta nella formazione di entrambi i sottotipi [132]. Nel cancro del colon-retto, in assenza di mutazioni di APC, si rilevano mutazioni di CTNNB1 che sono comunque in grado di attivare il *pathway* WNT/ β -catenina: tali mutazioni sono state trovate nel 50% dei tumori del colon in cui APC è *wild-type*.

MUTAZIONI DI AXINA. Un ruolo pregnante nella tumorigenesi è rivestito da Axina, codificata dal gene oncosoppressore *axin*, che è in grado normalmente di inibire il *signalling* WNT. Inizialmente identificata come prodotto del gene murino *fused*, è rinvenibile in due isoforme, Axina1 e Axina2, che si configurano entrambe come antagoniste del *pathway* WNT.

Axina1 è in grado di regolare negativamente il *pathway* WNT nella misura in cui funge da base strutturale del complesso di degradazione e, mantenendo GSK-3 β e β -catenina in stretta prossimità, facilita la fosforilazione di quest'ultima da parte della chinasi specifica. Alcuni studi dimostrano che l'Axina acquisisce la sua funzionalità in seguito alla formazione di omodimeri, modificazione che le conferisce la capacità di fungere da inibitore della trascrizione TCF/LEF-mediata [111]. È stato riscontrato inoltre che *axin 1*, omologo umano di *fused*, è un oncosoppressore, pertanto mutazioni di questo gene si ritrovano nei tumori, in particolare nel tumore epatocellulare. Con l'utilizzo di tecniche di *single strand conformation polymorphism* (SSCP) e *Real-time PCR* (RT-PCR) per lo *screening* di ampie mutazioni e sequenziamento diretto del DNA, si sono evidenziate mutazioni di *axin 1* nei sottogruppi di MB classico e desmoplastico. Una mutazione puntiforme missenso nell'esone 1 (Pro225Ser), codificante per il sito di legame ad APC, e sette ampie delezioni sono le alterazioni più ricorrenti. I residui di prolina rivestono un ruolo di primaria importanza nel determinare la struttura secondaria delle proteine, pertanto è verosimile che, una simile sostituzione, porti ad una

riduzione di affinità di legame tra Axina e APC, interazione necessaria per la degradazione di β -catenina. Per ciò che concerne le delezioni invece vengono generate proteine tronche che si comportano da dominanti negativi o proteine mancanti del dominio di dimerizzazione e quindi non più in grado di degradare β -catenina che, pertanto, si accumula [133]. E' stato rilevato che la quantità di β -catenina in pazienti con grosse delezioni in Axina1 sia significativamente più alta rispetto a pazienti senza questa mutazione [134].

L'Axina2, o Conducina, è anch'essa coinvolta in un *loop a feedback* negativo per il controllo del *signalling* WNT, fungendo da *scaffold* per il complesso multiproteico in grado di sequestrare β -catenina e avviarla alla degradazione. Axina2, in condizioni fisiologiche, è in grado di inibire il *pathway* WNT; qualora risulti mutata invece, ha significato tumorigenico aumentando la trascrizione TCF/LEF-mediata: forme troncate di Axina2 sono rinvenibili in forme di cancro colon-rettale con instabilità microsatellitare, così come in casi di epatocarcinoma o epatoblastoma, adenocarcinoma ovarico endometriode, nonché MB. Mentre per Axina1 la mutazione missenso caratteristica, identificata nei MB, si riscontra a livello della regione di *binding* con APC, Axina2 presenta diversi siti di mutazione. Sono state rilevate mutazioni somatiche *frameshift* o missenso a livello dell'esone 5 (D1103, ins2bp) e dell'esone 7 (D1103, Gln689Arg), nonché mutazioni germinali a livello dell'esone 5 (D755, Glu408Lys) o rari polimorfismi (D247II, Ser738Phe). Queste alterazioni hanno esito nella produzione di forme troncate di Axina2, per lo più difettive del dominio DIX (761-843) necessario per l'attivazione, mediante omo- ed etero-oligomerizzazione. Nei MB peraltro risultano *down-regolati* i livelli di trascrizione dell'mRNA di Axina2 che, contestualmente alla riduzione delle forme biologicamente attive della proteina, concorrono all'attivazione del sistema WNT [135].

MUTAZIONI DI APC. Completano il quadro delle alterazioni del sistema WNT correlate all'oncogenesi quelle a carico del gene APC, originariamente identificato come *target* delle mutazioni della linea germinale che causano FAP e tumori cerebrali che sono associati nella sindrome di Turcot. Come è noto, pazienti con FAP sviluppano precocemente adenomi intestinali multipli e portano mutazioni germinali non-senso del gene APC. Inoltre, mutazioni non-senso di APC sono associate ad oltre l'80% degli adenomi e carcinomi colon-rettali sporadici. Mutazioni missenso di APC sono state riscontrate invece nel 4,3% (2 casi su 46) di MB sporadici, nel carcinoma gastrico, nell'epatoblastoma e nel carcinoma pancreatico e della mammella.

Più del 95% delle mutazioni germinali o somatiche di APC, individuate nei pazienti con sindrome di Turcot o con carcinoma del colon-retto, sono mutazioni non-senso o *frameshift* che portano alla formazione di una proteina troncata mancante delle regioni critiche per la sua funzione nel complesso di degradazione: i siti di legame a β -catenina e Axina ed il sito di fosforilazione per GSK-3 β . La proteina APC troncata non promuove così la degradazione di β -catenina in modo efficace. Le mutazioni missenso di APC riscontrate nei MB sporadici potrebbero cambiarne la struttura tanto da impedirne il legame con β -catenina e/o Axina.

Nella maggior parte dei MB con mutazioni di APC, sia sporadici sia sindromici, non c'è LOH: solo in 1 caso su 7 di sindrome di Turcot e in 9 su 55 MB sporadici è stata osservata perdita dell'allele normale. Si è visto che proteine APC troncate che abbiano mantenuto i primi 171 aa possono associarsi *in vivo* a proteine *wild-type* ed inattivarle comportandosi quindi da dominanti negative. Resta da capire se anche proteine APC portanti mutazioni missenso agiscano nello stesso modo [133,136].

3. LA RISPOSTA BIOLOGICA ALLE RADIAZIONI IONIZZANTI

3.1 GENERALITÀ

La RT è una componente chiave dei moderni regimi terapeutici anti-neoplastici. Il razionale del trattamento con RI va ricercato nella loro capacità di attivare diversi meccanismi molecolari di soppressione della crescita tumorale: arresto del ciclo cellulare, induzione della senescenza, dell'apoptosi, del differenziamento terminale e della catastrofe mitotica. Dati recenti mostrano che molti, se non tutti, i *pathway* molecolari che mediano questi fenomeni sono strettamente interconnessi; sebbene rimanga da definire quale sia il loro singolo contributo e quali invece le interrelazioni reciproche nel determinare l'esito della RT, è chiaro che non sia un solo meccanismo a concorrere all'inibizione della crescita [137]. Vi sono sempre maggiori prove a favore del fatto che, il ruolo principale nel determinare la sensibilità dei tumori alle RI, sia svolto dal fenomeno della catastrofe mitotica. Nell'ambito di una popolazione tumorale le cellule che perdono i meccanismi di controllo dei *checkpoint* cellulari hanno un vantaggio proliferativo e si accumulano. In presenza di danno genotossico da chemioterapia o RT, questo significa non essere in grado di arrestarsi il tempo necessario per 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 [58].

3.2 LE RADIAZIONI IONIZZANTI

Le RI sono radiazioni corpuscolate (particelle α e β cariche elettricamente e neutroni) o non corpuscolate (fotoni che viaggiano nello spazio sotto forma di onde elettromagnetiche come i raggi X e γ) in grado di attraversare la materia e produrre ioni, direttamente o indirettamente, rilasciando energia. I raggi X e γ , pur essendo molto penetranti, si possono considerare a bassa densità di ionizzazione, mentre le radiazioni corpuscolare α , β e neutroniche, meno penetranti, sono da considerarsi ad alta densità di ionizzazione. La grandezza fondamentale, nel settore delle RI, è la dose assorbita, misurata in Gray e definita come l'energia assorbita per unità di massa (Gy): un Gy è pari a un joule di energia assorbita da un chilogrammo di materia.

Il bersaglio principale delle RI è costituito dal DNA che, interagendo con esse, ne risulta inevitabilmente danneggiato. L'entità del 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/ μm); in particolare si ha che le particelle α , β e i neutroni sono radiazioni ad alto LET, quindi con un maggior effetto biologico ed una minima capacità di penetrare i tessuti, mentre i raggi X e γ sono radiazioni a basso LET pertanto meno dannose.

Le RI danneggiano il DNA sia direttamente sia indirettamente, ovvero come conseguenza dello stress ossidativo che determinano. Le alterazioni del DNA consistono principalmente in rotture a singolo (*Single-Strand Breaks*, SSB) o doppio filamento (*Double-Strand Breaks*, DSB) dello scheletro zucchero-fosfato. Le RI

inducono inoltre *cross-linking* tra i filamenti di DNA e le proteine associate ai cromosomi nonché danni alle membrane cellulari [59]. I DSB rappresentano il principale tipo di lesione e, se non adeguatamente riparati, portano a morte cellulare per formazione di aberrazioni cromosomiche letali o per induzione diretta di apoptosi. D'altra parte, il riparo non effettuato o inadeguato dei DSB può portare, nelle cellule sopravvivenenti, a mutazioni o riarrangiamenti genomici e quindi a instabilità genetica e probabile trasformazione neoplastica maligna [60].

In virtù del loro meccanismo d'azione le RI sono quindi esse stesse mutagene e cancerogene; il loro ampio utilizzo a scopi terapeutici, nonostante il rischio che esse comportano, è però giustificato dal beneficio notevole e dall'efficacia che garantiscono, attualmente non eguagliabile dalla sola chemioterapia antitumorale.

3.3 LA RISPOSTA BIOLOGICA ALLE RADIAZIONI

I meccanismi di risposta al danno genotossico, compreso quello indotto da RI, consistono essenzialmente nell'attivazione dei meccanismi di riparo del DNA, accoppiati all'arresto del ciclo cellulare. Nel corso dell'evoluzione sono comparsi livelli di controllo complessi sostanzialmente incentrati sull'oncosoppressore p53, molecola chiave della risposta delle cellule di mammifero al danno a carico del DNA. Questi meccanismi di controllo servono sia a prolungare l'arresto ai vari *checkpoint* cellulari, sia ad eliminare le cellule danneggiate per apoptosi o per arresto irreversibile della crescita. Tali meccanismi sono accuratamente coordinati in modo da eliminare cellule con mutazioni pericolose e da evitare, al tempo stesso, la perdita di troppe cellule. Questa regolazione viene spesso a mancare nelle cellule tumorali, le quali tendono a perdere la funzionalità di p53 e i meccanismi di controllo che essa sovrintende [59].

Il fatto che vi siano risposte alternative alle RI, ovvero arresto della crescita o morte cellulare, suggerisce che esistano meccanismi

di controllo tali per cui la cellula possa “decidere” tra le opzioni possibili, scelta che sembra essere principalmente regolata da p53. Mentre per alcune tipologie cellulari la risposta è predeterminata, per molte altre la scelta tra apoptosi e blocco del ciclo cellulare dipende dalle condizioni di crescita e dalla gravità del danno [61]. Il ruolo di p53 nella sopravvivenza cellulare dopo trattamento con RI varia da un estremo all'altro: in diversi modelli cellulari, infatti, è stato riscontrato un aumento di radiosensibilità associato alla perdita di funzionalità di p53, mentre in altri, tale perdita, è stata correlata ad aumento della radioresistenza [62,63]. Secondo l'ipotesi più accreditata bassi livelli di p53 promuovono l'arresto del ciclo cellulare, e la contestuale riparazione del danno, mentre alti livelli inducono apoptosi. In particolare in cellule non danneggiate p53 è mantenuta a bassi livelli dal legame col suo regolatore negativo, MDM2. In seguito a danno RI-indotto, ATM promuove da un lato la fosforilazione di p53, inducendone l'attivazione e l'aumento, dall'altro quella di MDM2, avviandola alla degradazione. Recentemente è emerso come il quadro sia più complesso e come le RI, in maniera proporzionale alle dose, siano in grado di evocare oscillazioni dei livelli di p53, da cui dipenderebbe il destino cellulare, controllate da p53 stessa e da MDM2 con meccanismi molto complessi. E' stata inoltre descritta una forma di p53, definita *arrester*, fosforilata da ATM a livello della sola Ser-15 e in grado, mediante attivazione trascrizionale di p21, di determinare il blocco del ciclo cellulare e la riparazione del danno. L'ulteriore fosforilazione della Ser-46 porta invece ad una forma di p53, soprannominata *killer*, che induce apoptosi promuovendo l'espressione di geni pro-apoptotici quali p53AIP1; quest'ultimo induce il rilascio di CYTC, con conseguente dissipazione della membrana mitocondriale, e attivazione della Caspasi 3 (Casp3) [122].

Uno studio recente ha dimostrato come p53 sia una proteina prevalentemente nucleare nelle cellule differenziate e per lo più citoplasmatica nelle ESC (*Embryonal Stem Cells*); questa particolare localizzazione, e quindi il mantenimento di una forma inattiva della proteina, si spiega considerando il fatto che nelle ESC, in quanto cellule proliferanti, l'attività anti-proliferativa e pro-apoptotica di p53 non solo non è richiesta ma risulterebbe svantaggiosa. Malgrado queste premesse particolari condizioni di stress, quali le RI, determinano, anche in questo tipo di cellule, l'accumulo nucleare di p53, come meccanismo di risposta al danno RI-indotto. L'analisi della risposta p53-dipendente alle RI nelle ECS, effettuata confrontando cellule p53 -/- e p53 +/+, ha dato i seguenti risultati: in termini di Unità Formanti Colonie (UFC) si è vista una riduzione, dose-dipendente, della crescita più marcata nelle cellule p53 -/-; in termini di apoptosi è stato rilevato un discreto aumento percentuale per lo più in cellule p53 -/-; in termini di capacità proliferativa e vitalità infine questa è risultata maggiore in cellule p53 +/+. Questi dati depongono a favore dell'ipotesi che come la localizzazione citoplasmatica di p53, nelle ECS, sia funzionale alla loro attività proliferativa così l'accumulo nucleare indotto da RI ha un ruolo protettivo nei confronti del danno genotossico e concorre al mantenimento di un fenotipo indifferenziato [138].

3.4 RUOLO DI B-CATENINA NELLA RISPOSTA ALLE RADIAZIONI IONIZZANTI

Per quanto sia stato dimostrato il valore prognostico positivo di β -catenina nel MB non è stato ancora chiarito il suo ruolo nella regolazione del complesso equilibrio tra morte e proliferazione cellulare né la sua possibile funzione nella risposta cellulare alle RI [50]. Uno studio condotto su cellule epiteliali canine, non trasformate e trasfettate con β -catenina non degradabile, riporta come essa riduca il blocco G1/S indotto da raggi γ [123]. Un

lavoro su topi transgenici, esprimenti o difettivi per β -catenina, ha evidenziato la sua importanza come mediatore nella risposta alle RI in fibroblasti umani; in particolare si è visto che l'irradiazione comporta un notevole incremento dei livelli di β -catenina, indicativi dell'attivazione del *pathway* WNT, con conseguente azione facilitante la proliferazione e il mantenimento della vitalità cellulare; questi dati suggeriscono quindi che in fibroblasti, così come in altre cellule endoteliali, β -catenina conferisca radioresistenza [124]. Altri dati rendono conto del coinvolgimento di β -catenina nella radioresistenza del cancro alla mammella: colture primarie di *mammary epithelial cells* (MECs), estratte da topi BALB/c, esprimenti una forma stabile di β -catenina e irradiate con una dose di 2Gy, hanno dimostrato un aumento della sopravvivenza, e radioresistenza, delle cellule staminali tumorali. Queste ed altre evidenze depongono a favore dell'ipotesi che in dati sistemi, quali cellule ematopoietiche, cripte gastrointestinali, cellule della cresta neurale e dell'epidermide, β -catenina funga da fattore di sopravvivenza per le cellule tumorali, contrastando l'azione apoptotica indotta dalle RI [125]. La risposta β -catenina-mediata alle RI è comunque cellula e tessuto/tumore-dipendente il che potrebbe spiegare la variabilità della risposta tumorale alla RT [123]. Ad oggi in letteratura manca una spiegazione bio-molecolare del contributo di β -catenina alla suscettibilità del tumore alle RI; un lavoro orientato in tal senso è stato condotto studiando due linee cellulari di MB umano, per valutarne la risposta alle RI. In questo studio viene riportato l'aumento dei livelli β -catenina in entrambe le linee dimostrando che le RI attivano il *pathway* WNT, ma resta da chiarire quali siano gli effetti biologici dell'attivazione [126].

SCOPO

Il MB è considerato un tumore radiosensibile, pertanto la totalità dei protocolli terapeutici convenzionali combina, all'asportazione chirurgica del tumore primitivo, cicli di RT dell'intero nevrasso. Quest'ultima comporta però gravi sequele endocrine e neurocognitive, in particolare per i bambini con età inferiore agli 8 anni, in quanto il SNC nei pazienti pediatrici è ancora in via di sviluppo. Inoltre la RT è limitata da radioresistenza intrinseca in un terzo dei pazienti, in particolare appartenenti al gruppo ad alto rischio. La risposta alla RT è pertanto difficile da prevedere tanto più che la stratificazione del rischio, attualmente basata su parametri clinici, risulta imprecisa in una discreta percentuale di casi. Si sente la necessità quindi di affiancare nuovi fattori prognostici a quelli clinici utilizzati per migliorare la stratificazione del rischio, al fine di minimizzare la tossicità legata alla terapia senza compromettere l'efficacia terapeutica del trattamento [9]. Il MB è un tumore altamente eterogeneo e recenti studi genomici hanno suddiviso questa patologia in differenti *cluster* con uno specifico profilo molecolare. E' risultato che un sottogruppo di MB, caratterizzato da attivazione del sistema molecolare WNT/ β -catenina, è associato a prognosi migliore rispetto agli altri sottogruppi. La nucleopositività per β -catenina, indicativa di attivazione del sistema WNT, correla con un significativo miglioramento sia dell'OS che dell'EFS [92]. C'è grande consenso nel ritenere che dall'implementazione delle conoscenze sulla biologia del MB 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 [9].

Scopo della tesi è pertanto quello di chiarire se l'attivazione del sistema WNT nel MB umano sia associata ad una minore aggressività del tumore o ad un'aumentata risposta alla radioterapia [9]. Poiché non sono disponibili in commercio linee cellulari di MB umano con WNT attivato, diverse linee di MB sono state studiate al fine di effettuare una modificazione genetica per attivarne il sistema WNT. In particolare è stato condotto uno studio di *gain of function*, mantenendo una popolazione cellulare esprime una forma di β -catenina costitutivamente attiva, perché mutata nel sito di degradazione, ed una popolazione di controllo sottoposta alle medesime manipolazioni, ma priva del transgene. Questo disegno sperimentale ha permesso di eseguire un'analisi comparativa tra le due popolazioni cellulari, valutandone le differenze in termini di attivazione del sistema WNT, nella risposta biologica, in particolare valutata come crescita, mortalità cellulare, capacità invasiva e differenziamento, e nella risposta alle RI.

MATERIALI E METODI

1. LE LINEE CELLULARI

Abbiamo preso in considerazione 4 linee cellulari derivate da MB umano: UW228-1, D283MED, DAOY e ONS76.

UW228-1. Le UW228-1 sono una linea cellulare isolata da un MB sviluppatosi a livello della fossa posteriore e del verme cerebellare in una paziente dell'età di 9 anni [139]. Il tumore è composto da cellule piccole, densamente stipate, uniformi con nuclei ipercromici da ovali a rotondi, circondate da scarso citoplasma. In coltura crescono aderenti in monostrato, con tempi di duplicazione che vanno dalle 26 alle 43 ore. Raramente sono state trovate formazioni riconoscibili come pseudorosette. Si tratta di cellule aneuploidi con 57-59 cromosomi. Questa linea mostra un certo grado di poliploidia per ciò che concerne i cromosomi 1, 9, 15, 19, 20 e 21. Inoltre attraverso tecniche di citogenetica e di biologia molecolare si è riscontrata la presenza di LOH a livello di sequenze del cromosoma 17p distali al *locus* del gene oncosoppressore p53. Le cellule mostrano positività a sinaptofisina, vimentina, NSE e NFP. Il terreno utilizzato per le cellule in coltura è stato DMEM-F12 contenente 10% di FBS (*Foetal Bovine Serum*, Euroclone, Life Sciences Division, Milano, IT) inattivato al calore, 1% cocktail di penicillina/streptomicina (Euroclone; Milano, IT), 1% L-glutammina 2mM (Euroclone; Milano,

IT), 1% amminoacidi non essenziali (*Eagle's non essential amino acid*; Euroclone, Milano, IT).

D283MED. Le D283MED rappresentano, invece, una linea ipodiploide, isolata nel 1985 da un paziente maschio caucasico dell'età di 6 anni. Le cellule sono state prelevate da un sito metastatico nel peritoneo e dal liquido ascitico. Le cellule hanno morfologia epiteliale, crescono come sospensione di aggregati cellulari, con alcune cellule che aderiscono al supporto, e hanno un tempo di duplicazione di 37 ore. La differenziazione è in senso neuronale, con positività per *neural cell adhesion molecule 1* (NCAM), *L1 cell adhesion molecule* (L1CAM), NSE, NFP, sinaptofisina, mentre sono negative per EGFR, tenascina e GFAP. Non sono state evidenziate particolari mutazioni, anche se i geni testati sono pochi: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1* (BRAF), *v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog* (HRAS), *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS), *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog* (NRAS) [140,141].

DAOY. Le DAOY sono una linea ipertetraploide, isolata nel 1985 dalla biopsia di un MB primitivo del cervelletto di un paziente maschio caucasico dell'età di 4 anni, classificato come desmoplastico. Le cellule hanno forma poligonale, crescono aderenti ed hanno un tempo di duplicazione di 26.5 ore. Il tumore primitivo presentava differenziazione sia in senso neuronale che gliale. Le cellule si sono mostrate reattive per *markers* neuronali come NSE, NCAM e L1CAM, nonché *markers* gliali come tenascina, EGFR e altri; non sono positive per NFP, sinaptofisina e GFAP. Mutazioni note di questa linea cellulare si possono riscontrare in TP53, con sostituzione amminoacidica C242F omozigote, e in CDKN2A, con delezione M1*157 omozigote. Non sono state trovate mutazioni in APC, CTNNB1, EGFR, MYC, NOTCH1 e nella famiglia dei geni RAS [140,141].

Sia D283MED che DAOY sono state coltivate in MEM (*Minimum Essential Medium with earle's salt*, Euroclone; Milano, IT) con 20% di FBS, 1% di L-glutammina 2mM, 1% cocktail di penicillina/streptomina, 1% amminoacidi non essenziali, 1% di sodio piruvato (Euroclone; Milano, IT).

ONS76. L'ultima linea cellulare testata è rappresentata dalle ONS76. Questa linea è stata derivata nel 1989 da un tumore indifferenziato al cervelletto in una bambina di 2 anni. Le cellule hanno una morfologia epiteliale e in coltura crescono aderenti e in monostrato. I tempi di duplicazione di queste cellule sono circa di 18.6 ore. Studi di caratterizzazione immunofenotipica mostrano positività di queste cellule per i neurofilamenti e NSE. Inoltre risultano eterozigoti per NRAS e non mostrano mutazioni in CTNNB1 o APC [141]. Il terreno di coltura utilizzato è stato RPMI con FBS al 10%, 1% di L-glutammina 2mM, 1% cocktail penicillina/streptomina, 1% amminoacidi non essenziali.

UW228-1 e ONS76 sono state gentilmente fornite dal Dr. Charles G. Eberhart (John Hopkins University, Baltimora, USA); mentre D283MED e DAOY sono state ottenute dalla ATCC (*American Type Culture Collection; Manassas, VA*).

Tra le linee cellulari a nostra disposizione rientravano anche le D384 e le D341, linee caratterizzate da una crescita in sospensione e in virtù di questo scartate a priori in quanto non idonee alle metodiche di trasfezione previste per la realizzazione del nostro studio.

2. IL VETTORE PLASMIDICO

2.1 I PLASMIDI

Per modificare geneticamente le linee cellulari di MB umano sono stati utilizzati due plasmidi: uno contenente una forma mutata di β -catenina, non degradabile e in grado quindi di attivare costitutivamente il sistema WNT; l'altro difettivo per il transgene d'interesse (vettore vuoto), utilizzato come controllo di trasfezione.

PCI-NEO/B-CATENIN S33Y. In particolare, il vettore con β -catenina mutata (pCl-neo/ β -cateninS33Y) è costituito da un plasmide pCl-neo contenente l'intera sequenza cDNA di β -catenina (pertanto senza introni) recante una mutazione puntiforme (TCT→TAT), a livello di un sito di fosforilazione bersaglio di GSK-3 β . Questa alterazione porta alla traduzione di una tirosina al posto di una serina in posizione 33 della sequenza amminoacidica (S33Y) ed ha come effetto l'inibizione della fosforilazione da parte di GSK-3 β e della conseguente degradazione. L'espressione del transgene è regolata dal promotore di citomegalovirus (CMV), posizionato a monte del sito *polylinker* in cui è stato inserito il transgene. Per permettere la selezione delle cellule trasfettate, il plasmide contiene anche il gene che conferisce resistenza al trattamento antibiotico con neomicina (NeoR). La grandezza totale del vettore pCl-neo/ β -cateninS33Y è complessivamente di circa 7817 bp, mentre il solo transgene codificante per β -catenina mutata è intorno a 2345 bp (NCBI Reference Sequence: NM_001098209.1; NM_001098210.1) (Figura 9).

Il plasmide pCl-neo/ β -cateninS33Y è stato gentilmente fornito dal Dr. Hans Clevers (Utrecht University, Utrecht, Paesi Bassi).

VETTORE VUOTO pCI-NEO. Il corrispettivo di riferimento di questo costruito è rappresentato dal plasmide precedentemente descritto con esclusione del tratto corrispondente al transgene: si tratta quindi unicamente del plasmide *pCI-neo Mammalian Expression Vector* (Promega Corp.; Madison, WI, USA) privo della sequenza codificante per β -catenina e recante solo la sequenza di resistenza all'antibiotico. La dimensione di questo plasmide è quindi inferiore e si aggira attorno alle 5472 bp (GenBank®/EMBL Accession Number: U47120).

2.2 RESTRIZIONE DEL PLASMIDE

Prima di procedere alla trasfezione è stato innanzitutto necessario controllare l'integrità del plasmide d'interesse. A tal fine pCI-neo/ β -cateninS33Y è stato sottoposto a restrizione enzimatica con gli enzimi BamHI ed EcoRI (Promega; Madison, WI). Per ottimizzare la digestione, alla reazione è stata aggiunto un certo quantitativo di Buffer E (pH 7.5, TrisHCl 6mM, MgCl₂ 6mM, NaCl 100mM, DTT 1mM). Sono stati quindi preparati quattro campioni:

1. campione non digerito: contenente il DNA plasmidico (1 μ l), Buffer E (2 μ l), BSA (2 μ l), H₂O (15 μ l); la grandezza del plasmide è di 7817 bp ma, la banda risulterà di una grandezza inferiore poichè, essendo superavvolto, corre più velocemente.
2. campione digerito con BamHI: contenente DNA plasmidico (1 μ l), Buffer E (2 μ l), BSA (2 μ l), BamHI (1 μ l), H₂O (14 μ l); la grandezza attesa della banda è di 7817 bp, corrispondente al plasmide linearizzato.
3. campione digerito con EcoRI: contenente DNA (1 μ l), Buffer E (2 μ l), EcoRI (1 μ l), H₂O (14 μ l); la grandezza attesa della banda è di 7817 bp, corrispondente al plasmide linearizzato.
4. campione digerito con BamHI e EcoRI: contenete DNA plasmidico (1 μ l), Buffer E (2 μ l), BSA (2 μ l), EcoRI (1 μ l), BamHI

(1 µl), H₂O (13 µl); sono attese due bande della grandezza di 3300 bp e 4500 bp.

Dopo essere stati adeguatamente miscelati i campioni sono stati incubati a 37°C per un'ora.

Il prodotto della digestione enzimatica (20 µl) è stato miscelato con PCR loading buffer 6x (4 µl) ed è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio all'1%. Nel gel sono stati caricati i campioni sopra descritti ed il marker *TrackIt λ DNA/Hind III fragments* (Invitrogen; Paisley, UK) e la corsa è stata effettuata a 70 V costanti.

2.3 SEQUENZIAMENTO DEL TRANSGENE

REAZIONE DI SEQUENZA. La reazione di sequenza allestita, per verificare la corretta sequenza e la presenza della mutazione desiderata nel transgene β-cateninS33Y, si basa sul metodo Sanger, quindi sulla sintesi di DNA in presenza di nucleotidi di-deossitri-fosfato, coniugati ad un fluorocromo, i quali interrompono la reazione generando dei frammenti di DNA marcati di diverse lunghezze, che possono essere separati e rilevati tramite elettroforesi capillare, ricostruendo l'intera sequenza dell'amplificato.

Per la reazione è stato utilizzato il kit commerciale *ABI Prism Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems; Foster City, CA), il cui protocollo prevede le seguenti condizioni:

Buffer 5X	1,6 µl
BigDye	0,8 µl
Primer Forward (FW) o Reverse (RV) (3,2 µM)	1,0 µl
Plasmide pCl-neo/β-cateninS33Y	1,0 µl
H ₂ O dd	5,6 µl

	10,0 µl

I primer (Invitrogen; Paisley, UK) impiegati, in diverse combinazioni, per la reazione di sequenza sono stati:

CMV FW	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
	sequenza senso sul promotore CMV
T7 FW	5'-TTAATACGACTCACTATAGGC-3'
	sequenza senso sul promotore per l'RNA polimerasi T7
BCAT3 FW	5'-GATTTGATGGAGTTGGA-3'
	sequenza senso di β -cateninS33Y a livello dell'esone 3 [142]
BCAT3 RV	5'-TGTTCTTGAGTGAAGGACTGAG-3'
	sequenza anti-senso di β -cateninS33Y a livello dell'esone 3 [142]
BCAT4 RV	5'-TGTGGCAAGTTCTGCATCATC-3'
	sequenza anti-senso di β -cateninS33Y a livello dell'esone 4 [142]
T3 RV	5'-CATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'
	sequenza anti-senso del promotore per l'RNA polimerasi T3

Il termociclatore è stato impostato con il seguente programma:

	<i>Temp.</i>	<i>Durata</i>	<i>N° ripetizioni</i>
Denaturazione	96°C	10 sec	1
Denaturazione	96°C	10 sec	25 cicli
Ibridazione	50°C	5 sec	
Estensione	60°C	4 min	1

PURIFICAZIONE DELLA REAZIONE. Dopo la reazione di sequenza, il mix di amplificati è stato purificato tramite precipitazione in sodio acetato ed etanolo per eliminare i reagenti in eccesso.

La procedura consiste nelle seguenti fasi: in una piastra con 96 pozzetti, ad ogni reazione si aggiungono 1/10 del volume di sodio acetato (2,7 M, pH 5,2) e 2,5 volte il volume di etanolo (100%) e si lascia a -20°C per almeno 45 minuti; si centrifuga a 1650 x g per 40 minuti a 4°C e si eliminano etanolo e sodio acetato; si effettua un lavaggio con etanolo 70% e si centrifuga nuovamente a 1650 x g per 15 minuti a 4°C; si elimina l'etanolo, si centrifuga, capovolgendo la piastra, a 60 x g per 1 minuto per eliminare i residui di etanolo e si lascia asciugare la piastra a temperatura ambiente per circa 20 minuti.

ELETTROFORESI CAPILLARE DEGLI AMPLIFICATI, ANALISI DELLA SEQUENZA DI PAK3 E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI. La piastra contenente gli amplificati marcati e purificati, è stata caricata al sequenziatore a 48 capillari *ABI 3730 DNA analyzer* (Applied Biosystems; Foster City, CA) dopo aver aggiunto 10 µl di formamide in ogni pozzetto e aver denaturato a 96°C per 2 minuti.

I file generati al termine della corsa sono stati analizzati con i software *Sequencher* (Gene Code Corporation; Ann Arbor, MI) o *Finch TV* (Geospiza; Seattle, WA) che generano degli elettroferogrammi in cui vengono visualizzate le sequenze ottenute, le quali sono state confrontate con quelle di riferimento presenti nei database pubblici, come NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ed Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

3. IDONEITÀ DELLE LINEE ALLA TRASFEZIONE

3.1 EFFICIENZA DI TRASFEZIONE

Per valutare l'efficienza di trasfezione delle linee cellulari di MB umano a disposizione, è stata realizzata una co-trasfezione con lipofectamina (*Lipofectamine 2000*, Invitrogen; Paisley, UK) di un plasmide esprimente GFP (pIRES-EGFP, Clontech; Mountain View, CA) unitamente al plasmide d'interesse pCI-neo/ β -cateninS33Y. L'esperimento è stato condotto su tutte e 4 le linee cellulari di MB. Le cellule sono state piastrate 24 ore prima in piastre da 6-pozzetti ad una concentrazione di 100.000 cellule/pozzetto in terreno senza antibiotico. I pozzetti sono stati divisi in:

- controllo negativo: solo cellule per stabilire il *cut-off* di riferimento, senza aggiunta di nessun reagente;
- controllo con lipofectamina: aggiunta di sola lipofectamina per misurare la tossicità legata all'agente trasfettante;
- controllo con GFP: aggiunta di lipofectamina e pIRES-EGFP per misurare la capacità di emissione di fluorescenza del solo fluoroforo;
- β -catenina/GFP: aggiunta di plasmide pCI-neo/ β -cateninS33Y e plasmide pIRES-EGFP con lipofectamina per avere una misura effettiva della trasfezione del plasmide di interesse; in quest'ultimo caso la reazione e la lettura del preparato è stata fatta in triplicato.

Nella preparazione dei campioni è stato utilizzato un rapporto DNA:lipofectamina 1:10, combinando 500ng di DNA a 5 μ l di lipofectamina. In particolare 500ng di DNA (500ng pIRES-EGFP

per il controllo GFP; 450ng pCl-neo/ β -cateninS33Y+50ng pRES-EGFP per il campione β -catenina/GFP) sono stati diluiti in 250 μ l di Opti-MEM (Invitrogen; Paisley, UK) e mescolati accuratamente. In parallelo, 5 μ l di lipofectamina sono stati diluiti in 250 μ l di Opti-MEM ed incubati per 5 minuti a temperatura ambiente. Il DNA diluito è stato quindi unito alla lipofectamina diluita raggiungendo un valore totale di 500 μ l, mescolati delicatamente e lasciato in incubazione per 20 minuti a temperatura ambiente. Ogni campione è stato aggiunto al terreno di coltura nel pozzetto corrispondente. Il controllo negativo è stato lasciato in terreno di coltura senza sottoporlo ad alcun trattamento, mentre al controllo con lipofectamina è stata aggiunta lipofectamina (5 μ l) diluita in Opti-MEM (500 μ l); gli altri pozzetti sono stati addizionati dei complessi trasfettanti contenenti lipofectamina con il rispettivo DNA. Al controllo con la sola GFP è stato aggiunto pRES-EGFP/lipofectamina mentre ai campioni in triplicato sono stati dispensati i complessi trasfettanti completi. Le cellule così trattate sono state lasciate in incubazione a 37°C per 4 ore, a cui è seguito un cambio con terreno completo. Dopo 48 ore le cellule sono state staccate con tripsina/EDTA (Euroclone; Milano, IT), centrifugate a 771g per 5 minuti, risospese alla densità di circa 500.000 cellule/mL in PBS (Euroclone; Milano, IT) e mantenute in provette coperte d'alluminio per evitare il decadimento della fluorescenza. A questo punto si è proceduto alla misurazione della fluorescenza emessa da GFP mediante citofluorimetro (BD Facsaria Bioscience; New Jersey, USA) ed è stata calcolata la percentuale di cellule fluorescenti all'interno della popolazione totale per ogni linea.

3.2 MORTALITÀ IN RISPOSTA A G418

Al fine di selezionare dopo la trasfezione le cellule trasfettate da quelle trattate che non hanno ricevuto il plasmide d'interesse, è stata valutata la mortalità delle linee cellulari di MB non trasfettate in risposta al trattamento con G418 (Euroclone; Milano, IT), un analogo della neomicina. Come già accennato infatti, il

plasmide pCI-neo contiene il gene che conferisce alle cellule trasfettate la resistenza alla neomicina (NeoR), antibiotico che mantenuto a determinate concentrazioni per un certo numero di giorni uccide le cellule di mammifero, che non ne presentano resistenza intrinseca. Il G418 è un antibiotico della stessa famiglia della neomicina, utilizzato per la selezione di cloni di cellule animali che hanno acquisito la resistenza NeoR mediante trasfezione. La concentrazione di utilizzo del G418 può variare da 250 µg/mL a 1250 µg/mL.

E' stata quindi valutata la mortalità delle UW228-1, D283MED, DAOY e ONS76 non trasfettate in risposta al farmaco, al fine di determinarne la concentrazione e la durata del trattamento e verificare che non presentassero resistenza intrinseca. Le cellule sono state piastrate in pozzetti ad una concentrazione di 30.000 cellule/pozzetto nei rispettivi terreni di coltura; sono state testate concentrazioni differenti di farmaco ovvero 250, 500, 750, 1000, 1250 µg/µl, in modo da poter scegliere la dose ottimale da utilizzare durante la selezione. L'esperimento è stato della durata di 14 giorni, durante i quali il terreno col farmaco è stato cambiato ogni due giorni ed è stato osservato quotidianamente il raggiungimento della mortalità totale mediante microscopio ottico.

4. LA TRASFEZIONE STABILE

4.1 IL TRASFERIMENTO GENICO

Alla luce dei risultati emersi dalla prova di idoneità delle linee cellulari di MB umano alla trasfezione stabile, la linea UW228-1 è stata utilizzata ai fini di creare il nostro modello sperimentale. Le cellule sono state piastrate il giorno precedente la trasfezione in una piastra da 6-pozzetti ad una concentrazione di 100.000 cell/pozzetto, con 2mL di terreno (DMEM-F12) senza antibiotici. Avendo saggiato l'efficienza di trasfezione su un rapporto DNA:lipofectamina 1:10, ovvero 500 ng di DNA e 5µl di lipofectamina, i campioni sono stati preparati sulla base di questa proporzione. A partire dalle concentrazioni iniziali dei plasmidi, 4,76 µl del plasmide pCl-neo/ β -cateninS33Y (precedentemente diluito 1:10 in H₂O) sono stati uniti a 250 µl di Opti-MEM; mentre del plasmide pCl-neo sono stati prelevati 0,5 µl di e aggiunti anch'essi a 250 µl di Opti-MEM. Contestualmente 5 µl di lipofectamina sono stati uniti a 250 µl di Opti-MEM per ciascun plasmide e incubati a temperatura ambiente per 5 minuti. A questo punto le soluzioni (DNA+Opti-MEM e lipofectamina+Opti-MEM), adeguatamente preparate, sono state miscelate delicatamente e poste in incubazione a temperatura ambiente per 20 minuti. Trascorso il tempo di incubazione i complessi di DNA/lipofectamina così formati sono stati aggiunti goccia a goccia alle cellule precedentemente piastrate. La coltura è stata posta in incubazione per 4 ore, allo scadere delle quali si è proceduto al cambio terreno, in questo caso DMEM-F12 completo con antibiotici.

4.2 LA SELEZIONE ANTIBIOTICA

Le cellule così trasfettate con il plasmide pCl-neo/ β -cateninS33Y (UW-B) o col vettore vuoto pCl-neo (UW-V) sono state sottoposte a selezione antibiotica il giorno successivo alla trasfezione: per la durata di 14 giorni, le cellule sono state mantenute in coltura con l'usuale terreno DMEM-F12 completo, addizionato di 750 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ di G418 ed il terreno così composto è stato ripristinato ogni due giorni.

4.3 LA CLONAZIONE DELLE LINEE CELLULARI

Poiché ai fini del nostro studio è necessario realizzare dei sistemi che ripropongano *in vitro* le alterazioni da indagare, non è sufficiente una popolazione cellulare eterogenea che complessivamente si dimostri trasfettata in quanto, una valutazione globale, potrebbe falsare i risultati; occorre pertanto derivare la popolazione cellulare da una singola cellula trasfettata a garanzia del fatto che la linea che da essa origina contenga effettivamente il plasmide; da una singola cellula progenitrice quindi si ottengono dei cloni in maniera tale da avere popolazioni in cui tutti le cellule sono identiche tra loro.

DILUIZIONE LIMITE. Le cellule sono state staccate dal singolo pozzetto e diluite in terreno completo in modo da avere una sospensione cellulare iniziale di circa 1×10^5 cellule/ml. Attraverso una diluizione seriale, la sospensione di partenza è stata diluita di 10 volte ottenendo una concentrazione di 1×10^4 cellule/ml, poi di altre 10 volte ottenendo 1000 cellule/mL; con la terza diluizione sono state ottenute 100 cellule/mL e con la quarta 10 cellule/mL. Diluendo quest'ultima 3 volte, è stata ottenuta una diluizione di 3 cellule/mL, corrispondente a 0.3 cellule/100mL. Anche se teoricamente solo la diluizione finale dovrebbe garantire la selezione di cloni puri, sono stati piastrati anche 100 μl delle ultime tre diluizioni in piastre da 96 pozzetti. Da queste sono state ricavate diverse colonie cellulari considerando solo quei pozzetti in

cui risulti, all'osservazione al microscopio ottico, la presenza iniziale di una sola cellula. Nei giorni successivi è stata effettuata la sostituzione del terreno con DMEM-F12 addizionato di G418 in modo da permettere la selezione solo dei cloni in cui fosse effettivamente avvenuta la trasfezione.

Attraverso l'osservazione al microscopio, è stata valutata per un periodo di circa 3 settimane la crescita progressiva delle popolazioni cellulari. Una volta formatesi le colonie, sono state mantenute in piastre da 96-pozzetti fino al raggiungimento del grado di espansione e confluenza tale da poterle espandere.

L'ESPANSIONE DELLE COLONIE. Una volta ottenuto un numero discreto di cellule nei pozzetti delle piastre da 96, era necessario ampliare il quantitativo di cellule per le analisi successive e si è passati quindi alla fase di espansione. Per passare le cellule dalle piastre da 96-pozzetti a quelle da 24-pozzetti sono state utilizzate due differenti strategie in modo da comprendere quale fosse la più adeguata alle nostre cellule. In entrambi i casi, come da protocollo standard, le cellule sono state staccate togliendo il terreno, lavate in 100 μ l di PBS ed incubate per 5 minuti con 25 μ l di Tripsina/EDTA e 25 μ l di PBS/EDTA. L'azione digestiva della tripsina è stata inibita con 50 μ l di terreno fresco DMEM-F12 e a questo punto sono state intraprese due strade differenti:

1. per le colonie più ampie e proliferanti la sospensione cellulare è stata trasferita in provette sterili da 1.5 ml, ed è stata fatta una centrifuga a 1100 rpm per 5 minuti al termine della quale è stato aspirato il sovrnatante ed il *pellet* è stato risospeso in 500 μ l di DMEM-F12 addizionato di G418. Le cellule sono state poi seminate in piastre da 12 pozzetti;
2. per le colonie più piccole, dal momento che lo stress meccanico della centrifugazione avrebbe potuto danneggiare le cellule, sono stati aggiunti 400 μ l di terreno DMEM-F12, in cui le

cellule sono state risospese, e si è per ciò proceduto alla piastratura in piastre da 24-pozzetti. Poiché il terreno di coltura, in questo caso, conteneva ancora la tripsina (agente tossico per le cellule), anche se inattivata dalla presenza di FBS al 10% nel terreno di coltura, il giorno successivo è stato fatto un cambio di terreno con DMEM-F12 addizionato di G418.

Nel giro di diversi giorni le colonie sono state spostate in piastre di superficie sempre più ampia: da piastre da 24-pozzetti a piastre da 12-pozzetti, quindi a piastre da 6-pozzetti per giungere infine a una piastratura in fiasche T25. Durante i vari passaggi di espansione delle colonie, le cellule sono state osservate al microscopio in maniera tale da passare alla fase successiva solo una volta raggiunta un'adeguata confluenza (50%-70%); questo risulta essenziale poiché staccarle e piastrarle su superfici sempre maggiori comporta uno stress che, qualora eccessivo, ne comprometterebbe la futura proliferazione.

5. ANALISI MOLECOLARI

5.1 REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI

Isolati ed espansi i cloni trasfettati, occorre verificare la presenza del transgene β -cateninS33Y nei cloni UW-B. L'analisi è stata fatta mediante reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), confrontando i campioni UW-B con i cloni di controllo UW-V e la linea UW228-1 non trasfettata. Il rationale dell'esperimento consiste nel discriminare le prime in virtù della presenza di cDNA di β -catenina (senza introni), dalle altre che contengono unicamente la sequenza genomica di β -catenina. Inoltre è possibile verificare la presenza di β -catenina plasmidica, basandosi sulla combinazione del transgene e del promotore CMV, situazione riscontrabile solo nei cloni trasfettati UW-B. La mutazione specifica nel transgene è invece individuabile utilizzando un primer senso che ricada in 3' sulla mutazione: nel caso sia presente la mutazione di β -catenina il primer è in grado di appaiarsi alla sequenza ed avviare la reazione a catena; nel caso della sequenza *wild-type* di β -catenina questo specifico primer crea invece un *mismatch* A-G all'estremità 3', condizione che riduce del 90% l'efficienza di amplificazione.

ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE. Per ricavare una quantità sufficiente di DNA (sia genomico che plasmidico) sono state raccolte 1×10^6 cellule per ciascuna colonia. La sospensione cellulare è stata quindi centrifugata a 300 g per procedere alla fase successiva di estrazione, eseguita utilizzando il *DNAeasy Blood and Tissue kit* (Quiagen, Milano, IT). Per evitare contaminazioni tra il DNA delle linee di controllo (UW228-1 e UW-V) con quello delle UW-B, l'estrazione è stata pianificata in giorni differenti.

Ad esperimento concluso la bontà dell'estrazione è stata valutata mediante quantificazione al Nanodrop (ND-800, Spectrophotometer) ad una lunghezza d'onda (λ) di 260 nm; in particolare l'assorbanza misurata, relativa alla concentrazione di DNA, doveva essere compresa nel range 0.1-1.0, mentre il rapporto λ 260 nm/280 nm, indicativo della purezza del campione, doveva essere incluso nell'intervallo 1.8- 2.0. Ogni campione è stato quindi portato ad una concentrazione finale di 100 ng/ μ L di DNA totale estratto, diluendolo in H₂O dd.

AMPLIFICAZIONE GENOMICA MEDIANTE PCR. Una volta estratto il DNA dalle colonie trasfettate sono state eseguite due prove complementari di PCR per verificare la presenza del transgene nelle colonie UW-B e la sua assenza nelle linee di controllo, utilizzando due diverse coppie di primer:

- BCAT3 FW + BCAT4 RV, che amplificano la sequenza compresa tra l'esone 3 di β -catenina e l'esone 4, permettendo di discriminare β -catenina in virtù della grandezza dell'amplificato. L'amplificato del transgene infatti manca dell'introne 3, essendo una sequenza di cDNA, mentre la sequenza di β -catenina genomica risulta di dimensioni maggiori. Ci si aspetta pertanto che le linee UW228-1 e UW-V possiedano solo la sola forma genomica della sequenza, mentre le colonie UW-B abbiano sia la forma genomica che quella plasmidica.
- CMV FW + BCAT3 RV, che amplificano unicamente la sequenza di β -catenina esogena in quanto il promotore di CMV non è rinvenibile nel genoma umano, ma è presente nel plasmide pCI-neo/ β -cateninS33Y in posizione utile per far avvenire la reazione. Da questa combinazione, i risultati attesi sono che le UW228-1 e UW-V diano un risultato negativo, mentre le UW-B siano le uniche a mostrare un amplificato.

- BCATS33Y FW [5'- CAGCAACAGTCTTACCTGGACTA-3'] + BCAT4 RV, che amplificano la sequenza di β -catenina portante la mutazione S33Y. Nel DNA genomico estratto dai vari campioni ci si aspetta che la sequenza di β -catenina sia *wild-type*, non portante la mutazione. Anche da questa combinazione, pertanto, i risultati attesi sono che le UW228-1 e UW-V diano un risultato negativo, mentre le UW-B contengano un amplificato.

Salvo differire per la coppia di primer impiegati, i due esperimenti di PCR sono stati svolti, per ciascun campione, seguendo il medesimo protocollo e utilizzando lo stesso materiale: *AmpliTaq DNA Polymerase* e buffer annessi (Applied Biosystems; Foster City, CA). Avendo cura di mantenere reagenti e campioni in ghiaccio, dopo averli vortexati e spinnati ciascuno, è stata preparata una miscela per PCR contenente:

DNA	200 ng
AmpliTaq	0.1 μ L
Primer Forward (FW)	0.2 μ M
Primer Reverse (RV)	0.2 μ M
dNTPs	0.2 mM
MgCl ²	1.5 mM
Buffer 10x	1x
H ₂ O dd	fino a volume totale di 20,0 μ l

Nella fase di pre-PCR è stata prestata particolare attenzione alle contaminazioni, preparando le provette relative ai campioni UW-B e ai campioni di controllo (UW228-1 e UW-V) in due spazi separati. Sono stati quindi dispensati 200 ng (2 μ L) di DNA totale estratto da ogni campione in diverse provette da 0.2 mL. Per semplificare la procedura è stata preparata una PCR-MIX (*Mastermix*) per un volume totale sufficiente a preparare tutti i

campioni, contenente tutti i reagenti eccetto la Taq polimerasi ed il DNA. Finita di preparare la *Mastermix*, vi è stata aggiunta la Taq, mantenuta in freezer a -20°C fino a quel momento, ed il tutto è stato vortexato e spinnato, per poi essere dispensato (18 µL) in ciascuna provetta contenente il DNA.

Il termociclatore (*T Gradient T1 Thermocycler*, Whatman Biometra; Goettingen, DE) è stato impostato con il seguente programma:

	Temp.	Durata	N° ripetizioni
Denaturazione	94°C	2 min	1
Denaturazione	94°C	35 sec	30 cicli
Annealing	63°C	35 sec	
Allungamento	72°C	40 sec	
Estensione	72°C	10 min	1

CORSA ELETTROFORETICA SU GEL DI AGAROSIO. Una volta terminata la reazione, per visualizzare l'amplificato i campioni sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1%, preparato sciogliendo 1 gr di agarosio in 100 ml di TAE 1x e aggiungendovi 20 µL di colorante (*SYBR safe DNA Gel Stain*, Invitrogen; Paisley, UK). Per evitare di contaminare successive PCR, questa fase di post-PCR è stata svolta in un ambiente separato da quello della pre-PCR. I campioni sono stati opportunamente miscelati con *Loading buffer 6X* (TRIS-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM pH 7.4, Blu di Bromofenolo 0,05%, Glicerolo 50%), aggiungendo 4 µL di *Loading buffer* ai 20 µL di amplificato, e quindi sono stati caricati nei pozzetti del gel e sottoposti ad una differenza di potenziale di 70 volts costante per circa due ore. Per quantificare la grandezza degli amplificati sono stati caricati alle due estremità del gel 20 µL di *DNA ladder (TrackIt 1Kb plus DNA ladder*, Invitrogen; Paisley, UK), opportunamente diluiti (2 µL

di *DNA ladder* e 18 μl di H_2O dd). Una volta terminata la corsa è stata valutata la presenza delle bande attese al transillumnatore.

5.2 WESTERN BLOTTING

Al fine di valutare e quantificare l'espressione proteica di β -catenina nucleare e di p53, MYC e ciclina D1 totali sono state effettuate analisi di Western Blotting (WB) su estratti proteici nucleari o totali, a seconda dell'esperimento.

PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PROTEICI CELLULARI NUCLEARI. L'estratto proteico nucleare si ottiene mediante il seguente procedimento: le cellule sono state lavate due volte con PBS freddo, staccate per mezzo di un *cell-scraper* facendo attenzione a tenere la fiasca in ghiaccio. La sospensione cellulare in PBS freddo è stata in seguito trasferita in una provetta da 15 mL e centrifugata a 771g per 5 minuti a 4°C. Dopo aver scartato il sovrnatante, il *pellet* è stato risospeso in 1 mL di PBS e dopo averlo trasferito in provette da 1,5/2 mL è stato centrifugato nuovamente a 367g per 8 minuti a 4°C. Al *pellet* cellulare che si ottiene vengono aggiunti 500 μL di buffer ipotonico (HEPES 10mM pH 7.9, MgCl_2 1.5mM, KCl 10mM) con aggiunta di un cocktail di inibitori delle proteasi (*Complete EDTA-free*, Roched Diagnostic; Indianapolis, IN) 2x e si procede quindi subito ad una centrifuga a 367g per 5 minuti a 4°C, questo viene fatto per eliminare i sali residui di PBS ed avvinare le cellule. Si scarta ancora una volta il sovrnatante, si aggiungono 200 μL di buffer ipotonico addizionato di soluzione *Complete* 2x e si lascia in incubazione per 10 minuti in ghiaccio, siringando ogni tanto. Dopo aver centrifugato a 827g per 15 minuti a 4°C, nel sovrnatante si trovano le proteine citoplasmatiche, nel *pellet* si hanno i nuclei isolati che vengono trattati con 50 μl di LOW buffer (HEPES 20mM pH 7.9, Glicerolo 25%, KCl 20mM, MgCl_2 1.5mM, EDTA 0.2mM) e 50 μl di HIGH buffer (HEPES 20mM pH 7.9, Glicerolo 25%, KCl 1.2M, MgCl_2 1.5mM, EDTA 0.2mM), entrambi con aggiunta del *Complete* 2x. I campioni vengono quindi lasciati

in incubazione in ghiaccio per 30 minuti, siringando e vortexando di tanto in tanto. Finita l'incubazione, si procede ad una centrifuga a 13225g per 30 minuti a 4°C e il sovranatante, contenente le proteine, aliquotato in provette da 0.2 mL, viene congelato in azoto liquido e conservato a -80°C. La quantificazione delle proteine presenti nell'estratto cellulare è effettuata allo spettrofotometro (Ultrospec 1000, Amersham Pharmacia Biotech; Little Chalfont, UK), utilizzando il *Dye Reagent* (Bio-rad Laboratories GmbH; Munchen, DE) per il saggio di Bradford.

PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PROTEICI CELLULARI TOTALI. Per ottenere l'estratto proteico totale, le cellule sono state lavate due volte con PBS freddo, staccate per mezzo di uno *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 minuti a 4°C. Scartato il sovrinatante, il *pellet* cellulare è stato risospeso in 1 mL di PBS e dopo averlo trasferito in provetta da 2 mL è stato ricentrifugato a 367g per 8 minuti a 4°C. Scartato nuovamente il sovrinatante, al *pellet* cellulare sono stati aggiunti circa 80-100 µl (a seconda della quantità di *pellet*) di buffer di lisi totale (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 2x ed è stato lasciato in incubazione in ghiaccio per 20 minuti, siringando e vortexando ogni tanto. Finita l'incubazione, la sospensione è stata centrifugata a 18000g per 30 minuti a 4°C. La quantificazione delle proteine presenti nell'estratto cellulare è stata effettuata allo spettrofotometro, utilizzando il *Dye Reagent* per il saggio di Bradford.

CORSA ELETTROFORETICA SU GEL DI POLIACRILAMMIDE, BLOTTING E RILEVAZIONE. 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 minuti.

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, filtrale membrane sono state colorate 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 minuti 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 minuti e gli altri di 5 minuti e incubata con l'anticorpo primario *overnight* a 4°C nel caso della valutazione di p53, MYC, ciclina D e lamina B; per 60 minuti a temperatura ambiente nel caso di β -catenina e actina. 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 minuti a temperatura ambiente. Dopo 5 lavaggi in TBS-T, il primo di 15 minuti e gli altri di 5 minuti, la membrana è stata incubata per 1 minuto a temperatura ambiente e al buio con il kit *Enhanced chemoluminescence plus* (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 (Canon 993 OF) 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 stati:

- anticorpo policlonale di coniglio anti- β catenina (H-102, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca) diluito 1:1000 in blocking solution;
- anticorpo monoclonale di topo anti-p53 (1C12, Cell Signaling Technology; Danvers, MA) diluito 1:2000 in blocking solution;
- anticorpo monoclonale di topo anti-ciclina D1 (A-12, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca) diluito 1:100 in blocking solution;
- anticorpo monoclonale di topo anti-MYC (Ab-2, Calbiochem) diluito 1:500 in blocking solution;
- anticorpo policlonale di capra anti- β actina (I-19, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca) diluito 1:1000 in blocking solution;
- anticorpo monoclonale di topo anti-lamina B1 (ZL-b, abcam, Cambridge, United Kingdom) diluito 1:400 in blocking solution.

Gli anticorpi secondari HRP coniugati utilizzati sono stati:

- anticorpo anti-immunoglobuline di coniglio (Na934, Ge Healthcare Europe GmbH, Freinurg, Germany) 1:10000 in blocking solution;
- anticorpo anti-immunoglobuline di topo (Na93, Ge Healthcare Europe GmbH, Freinurg, Germany) 1:10000 in blocking solution;
- anticorpo anti-immunoglobuline di capra (SC-2020, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca) 1:100 in blocking solution.

L'espressione di β -catenina e lamina B1 è stata valutata negli estratti proteici nucleari, mentre quella di p53, ciclina D1, MYC e β -actina è stata saggiata negli estratti proteici totali. Lamina B1 e

β -actina sono state utilizzate come controllo di caricamento per gli estratti nucleari e totali rispettivamente.

5.3 IMMUNOFLOURESCENZA

Per verificare la localizzazione subcellulare di β -catenina è stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza (IF). Inoltre mediante IF è stata valutata l'espressione di alcuni antigeni neuronali che caratterizzano l'immunofenotipo del MB e correlano con il differenziamento.

Nella reazione di IF sono stati inclusi i seguenti controlli:

- cellule incubate solo con l'anticorpo secondario in modo da valutare la fluorescenza di fondo data dai legami aspecifici dell'anticorpo secondario al campione;
- cellule non trattate con alcun anticorpo per valutarne l'autofluorescenza.

Per la reazione sono state piastrate 100.000 cellule in 2 ml di terreno, seminandole su vetrini coprioggetto autoclavati e inseriti in pozzetti di piastre da 6 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, DE) 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 minuti per permeabilizzare le membrane citoplasmatiche e nucleari e lavati 3 volte per 3 minuti ciascuno in PBS. Successivamente i vetrini sono stati trattati con *Albumin bovine serum* (BSA, Minimum 98%, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) all'1% in PBS per 30 minuti a 37°C per saturarne i siti aspecifici. I campioni sono stati quindi incubati con l'anticorpo primario a 37° per 60 minuti. Effettuati 6 lavaggi in PBS di 3 minuti ciascuno, i campioni sono stati incubati al buio con l'anticorpo secondario per 60 minuti a 37°C; quindi la superficie del vetrino è stata lavata per 3 volte

per 3 minuti 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; Paisley, UK). I campioni sono stati infine esaminati usando un microscopio a fluorescenza (Carl Zeiss S.p.A; DE) mediante filtri appropriati.

Gli anticorpi primari utilizzati sono stati:

- anticorpo policlonale di coniglio anti- β catenina (H-102) diluito 1:100 in PBS/BSA 1%;
- anticorpo monoclonale di topo anti-neurofilamenti ad alto peso molecolare NF-H (NF-01) alla concentrazione di 9.7 mg/ml;
- anticorpo monoclonale di topo anti-neurofilamenti a peso molecolare medio NF-M (NF-09) a 12.4 mg/ml;
- anticorpo monoclonale di topo anti-GFAP (GF-01) alla concentrazione di 10.4 mg/ml.

Gli anticorpi secondari HRP coniugati utilizzati sono stati:

- anticorpo suino anti-immunoglobuline di coniglio coniugato al fluorocromo FITC (Dako Cytomation; Glostrup, Denmark) diluito 1:100 in PBS/BSA 1%;
- anticorpo anti-immunoglobine di topo coniugato al fluorocromo TRITC (T6653, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca) diluito 1:500 in PBS/BSA 1%.

Gli anticorpi primari per NF-H, NF-M, e GFAP sono stati gentilmente forniti dal Dott. Pavel Dràber (Institute of Molecular Genetics; Prague, Czech Republic).

6. ANALISI BIOLOGICHE

Al fine di valutare gli effetti biologici indotti dall'attivazione del sistema WNT nel nostro modello sperimentale, le linee UW-B, UW-V e UW228-1 sono state analizzate in termini di crescita cellulare, mortalità, capacità invasiva e morfologia cellulare. Quest'ultima, valutata mediante microscopia ottica ed elettronica unitamente all'espressione degli antigeni neuronali, può dare indicazioni circa il differenziamento dei vari campioni. Inoltre per studiare gli effetti dell'attivazione del WNT nella risposta alle RI, le cellule, dopo essere state sottoposte a trattamento con RI, sono state saggiate in termini di crescita e mortalità cellulare, confrontandole con le rispettive controparti non irradiate.

6.1 TRATTAMENTO CON LE RADIAZIONI IONIZZANTI

Le colonie UW-B, UW-V e la linea UW228-1 sono state piastrate almeno 24 ore prima del trattamento e sono state irradiate con raggi γ (sorgente ^{137}Cs) alla dose di 2Gy/min mediante l'utilizzo dell'irradiatore cellulare Biologique 437C (CIS-BIO; Cedex, FR).

6.2 CURVA DI CRESCITA

Sono state allestite curve di crescita per le linee UW-B, UW-B RI, UW-V e UW-V RI, a 0, 24, 48, 72 e 96 ore dalle RI (dopo 24 ore dalla piastratura). Inoltre anche le linee di controllo UW-V e UW228-1 sono confrontate per la crescita cellulare.

Sono state piastrate 200.000 cellule in fiasca T25, preparando tre fiasche per 5 giorni successivi, quindi in tutto 15 fiasche per linea cellulare e trattamento. Ogni giorno alla stessa ora sono state staccate, colorate con Trypan Blue (Sigma-Aldrich; S. Louis, MO) e contate le cellule di tre fiasche per ogni linea in camera di

Neubauer, mediante microscopio ottico (Nikon Eclipse TS100, Nikon Instruments s.p.a, FI). Dopo aver eseguito la media delle conte in triplicato per le cellule vive è stata calcolata la vitalità cellulare utilizzando gli opportuni fattori di correzione ovvero $n^{\circ}\text{cellule vive} * 5.000 * 0.5$ (fattore di diluizione) ed i dati sono stati plottati in grafico con tempo in ascissa e numero di cellule in ordinata.

6.3 MORTALITA' CELLULARE

La mortalità cellulare è stata valutata nelle colonie UW-B, UW-B RI, UW-V e UW-V RI, a 48, 72 e 96 ore dalle RI (dopo 24 ore dalla piastratura), utilizzando il saggio di esclusione con Trypan Blue. Anche la mortalità delle linee di controllo UW-V e UW228-1 è stata valutata, confrontandole però a 24, 48, 72, 96, 120 ore dalla messa in coltura.

Le cellule sono state piastrate in fiasche T25 ad una concentrazione di 200.000 cellule/fiasca. Per ogni linea e trattato sono state preparate 3 fiasche, il giorno successivo i campioni da irradiare sono stati sottoposti al trattamento ed agli orari prestabiliti sono state contate 3 fiasche per ogni linea e trattamento. In particolare, ogni 24 ore le cellule sono state staccate, lavate e risospese in PBS. Un'aliquota di sospensione omogenea è stata miscelata a Trypan Blue, con diluizione 1:2 e inserita in camera di Neubauer. Mediante microscopio ottico, si è proceduto alla conta delle cellule totali e morte presenti nei quattro quadranti della camera di conta. Dopo aver eseguito la media delle conte in triplicato è stata calcolata la mortalità cellulare come percentuale di cellule morte rispetto alla totalità ($n^{\circ}\text{cellule morte} / n^{\circ}\text{cellule morte} + n^{\circ}\text{cellule vive} * 100$).

6.4 SAGGIO DI INVASIONE

La membrana basale è una sottile matrice extracellulare (ECM) situata al di sotto di cellule epiteliali ed endoteliali, che separa questi tessuti dallo stroma. Le cellule tumorali in grado di superare

tale membrana basale sono anche in grado di invadere i tessuti e formare metastasi a distanza. Tra i test in grado di valutare questa tendenza all'invasione, l'impiego del Matrigel® è una delle tecniche più robuste, affidabili e rappresentative della situazione *in vivo*. La capacità invasiva attraverso una membrana di Matrigel® delle linee UW-B, UW-V e UW228-1 è stata valutata dopo 24 ore dall'allestimento dell'esperimento.

TEST DI CHEMIOINVASIONE. Tutto l'esperimento viene effettuato in sterilità, sotto cappa a flusso laminare. Il test inizia con la preparazione dei filtri di policarbonato con pori di 8 µm (NeuroProbe Inc.; Gaithersburg, MD, USA), posizionati in una petri dish, che devono essere coattati dal lato opaco del filtro, con 50 µL di Matrigel® (BD Bioscience; Bedford, MA, USA) al 6,8% (la concentrazione ottimale è stata messa a punto dopo una serie di prove a diluzioni crescenti). È importante che l'aliquota d'uso di Matrigel® venga scongelata in ghiaccio e a +4 °C e mantenuta fino alla stesura sul filtro in ghiaccio, in quanto il gel polimerizza irreversibilmente a temperatura ambiente. Il filtro viene coperto dal Matrigel® in modo uniforme, lasciato asciugare sotto cappa di riduzione e successivamente posto a +4 °C overnight. Nella messa a punto dell'esperimento è emerso che un periodo di asciugatura prolungato è cruciale per ottenere la riproducibilità. Il giorno seguente i filtri vengono prelevati dalla piastra e posti nelle camerette d'invasione di Boyden, già preparate con 35 µL di terreno al 10% FBS (un blando chemioattrattivo) nella parte inferiore, con lo strato di Matrigel® rivolto verso l'alto. Particolare attenzione deve essere posta al condizionamento del filtro: il terreno presente nella camera d'invasione deve bagnare la parte lucida del filtro ma non passare sulla parte coattata con il Matrigel®. Le camere di invasione vengono quindi chiuse e all'interno del tappo, in comunicazione con la parte centrale del filtro, vengono poste 50.000 cellule risospese in terreno senza siero (dopo un lavaggio in tampone fosfato). Trascorse 24 ore di

tempo le camere vengono svuotate e aperte, i filtri vengono ripresi e lavati brevemente in H₂O dd. In seguito sono posti su un supporto in paraffina con la parte lucida (in cui si trovano le cellule che hanno invaso) rivolta verso l'alto. A questo punto le cellule vengono fissate con un passaggio rapido (circa 1 minuto) in etanolo assoluto, rimosso con due lavaggi in H₂O dd. Da questo momento non è più necessaria la sterilità e i filtri vengono portati sotto cappa chimica per la colorazione.

COLORAZIONE E VISUALIZZAZIONE DEI RISULTATI IN MICROSCOPIA OTTICA.

Per la visualizzazione dei filtri è stata scelta una colorazione in May Grunwald – Giemsa, in modo da evidenziare sia il nucleo, sia il citoplasma delle cellule che hanno invaso. Il May-Grunwald è il primo colorante che viene impiegato, si tratta di eosinato di blu di metilene, utilizzato 1:1, con poche gocce direttamente sopra il filtro, per 9 minuti. Al termine del tempo si aggiunge circa 1,5 mL di H₂O dd e si lascia agire per 1 minuto ulteriore. Dopo alcuni lavaggi si passa al secondo colorante, il Giemsa, una miscela complessa di blu di metilene cloruro, blu di metilene eosinato e azzurro Il eosinato. Questo viene usato in diluzione 1:2 per 9 minuti. I filtri vengono quindi risciacquati abbondantemente e lasciati asciugare sotto cappa chimica. Dopo la colorazione i filtri vengono posti su un vetrino, con la parte lucida rivolta verso il vetro, e si procede a rimuovere lo strato di Matrigel® tramite un tampone imbibito di H₂O dd. Questa è una parte delicata, in quanto May Grunwald e Giemsa tendono a cross-reagire formando un precipitato che va rimosso, insieme al gel (che contiene cellule non migrate). Sul filtro pulito viene poi montato il coprioggetto e il vetrino può essere osservato.

Il vetrino con il filtro è stato osservato ad un ingrandimento di 10X e 40X sul microscopio ottico Axiostar Plus (Carl Zeiss Microimaging LLC, USA) e in seguito fotografato (fotocamera Nikon Digital Sight DS-U1, Nikon; USA) a 10X nella sua interezza. Per l'analisi è stato

utilizzato il programma Image Pro-Plus (Media Cybernetics Inc.; Bethesda, MD, USA) con contatore di cellule.

6.5 MORFOLOGIA CELLULARE

MICROSCOPIA OTTICA. Sono state seminate 200.000 cellule delle linee cellulari UW228-1, UW-V e UW-B in fiasche T25 e sono state osservate a 24, 48, 72, 96, 120 ore dalla piastratura agli ingrandimenti di 5X, 10X e 20X sul microscopio ottico. Sono state quindi fotografate con la macchina fotografica digitale (OLYMPUS C-5060, Olympus Italia; Segrate, MI), così da poter seguire e descrivere in modo dettagliato la morfologia cellulare.

MICROSCOPIA ELETTRONICA. Sono state seminate 76.800 cellule/pozzetto in una piastra da 6 per colture cellulari. Le cellule delle linee UW-B, UW-V e UW228-1 sono state fissate sul fondo del pozzetto a 24 e 96 ore dalla piastratura, orari scelti sulla base delle osservazioni fatte in microscopia ottica, utilizzando glutaraldeide al 2,5% in tampone cacodilato 0,1 M, pH 7,2 a 4°C per 30 minuti. Sono stati effettuati, due lavaggi in tampone cacodilato 0,15 M pH 7,2 da due minuti ciascuno a temperatura ambiente e successivamente le cellule sono state incubate in tetrossido di osmio 1% in tampone cacodilato 0,1 M, pH 7,2 per 1 ora; in seguito è stato fatto un lavaggio in tampone cacodilato 0,15 M pH 7,2 da 10 minuti. I campioni sono stati disidratati effettuando due passaggi in etanolo 70% da 5 minuti ciascuno, tre passaggi in etanolo 95% della durata di 2 minuti e 30 secondi l'uno e tre passaggi in etanolo 100% di 2 minuti e 30 secondi. Una volta tolto l'etanolo al 100% è stato aggiunto ossido di propilene e, con l'ausilio di una pipetta *pasteur* di vetro, è stato raccolto il sottile strato di cellule dal fondo del pozzetto ed è stato trasferito in una provetta da 1,5 ml nella quale è stato aggiunto un ulteriore quantitativo di ossido di propilene. Le provette sono state centrifugate a 20.664g per 5 minuti in modo da compattare le cellule sul fondo della provetta, l'ossido di propilene è stato

sostituito e tenuto in incubazione per 2 minuti e 30 secondi. Per la fase dell'impregnazione la resina epossidica è stata preparata con 50 ml di Araldite CY 212 (Epossido), 50 ml di Araldite Hardener HY 8964 (Indurente) e 1,5 ml di Araldite Accelerator DY 964 (Catalizzatore). Il *pellet* di cellule è stato lasciato immerso con resina epossidica:ossido di propilene 1:1 per due passaggi da 15 minuti ciascuno a 40°-45°C, poi con resina:ossido di propilene 3:1 due volte per 30 minuti ciascuno a 40°-45°C, ed infine è stato lasciato in resina:ossido di propilene 15:1 per 30 minuti a 40°-45°C. Prima della polimerizzazione della resina, il *pellet* di cellule è stato trasferito mediante una pasteur di vetro in una capsula da inclusione, precedentemente riempita a metà di resina epossidica e posto in stufa a 60°-72 °C per 24/72 ore. I campioni sono stati poi sezionati con un ultramicrotomo; le sezioni sono state raccolte sui retini di osservazione e contrastati con acetato di uranile e citrato di piombo. I retini sono stati poi osservati al microscopio elettronico a trasmissione (Philips CM 10, Philips; Amsterdam, NL) e le cellule più rappresentative sono state fotografate con la telecamera (Mega View III, Olympus Italia; Segrate, MI).

7. ANALISI STATISTICA

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

RISULTATI

1. IL MODELLO SPERIMENTALE

1.1 IL VETTORE pCI-NEO/ β -CATENIN S33Y

INTEGRITÀ DEL PLASMIDE. Attraverso le prove di restrizione del plasmide pCI-neo/ β -cateninS33Y abbiamo potuto verificarne l'integrità. Le digestioni enzimatiche singole, sia con BamHI che con EcoRI, hanno prodotto il plasmide linearizzato, visualizzato con una banda unica di circa 7800 bp. In seguito a doppia digestione con entrambi gli enzimi di restrizione BamHI e EcoRI sono state osservate due bande, corrispondenti ai frammenti della lunghezza attesa: 3300 bp e 4500 bp (Figura 10).

PRESENZA DELLA MUTAZIONE NEL TRANSGENE. Il sequenziamento del transgene ha verificato la correttezza della sequenza del transgene β -cateninS33Y e la presenza della mutazione attivante.

1.2 LE LINEE CELLULARI DI MB

PERCENTUALE DI EFFICIENZA DI TRASFEZIONE. Gli esperimenti di co-trasfezione di pIRES-EGFP e pCIneo/ β -cateninS33Y hanno dato i seguenti risultati di efficienza: UW228-1 36.7%, D283MED 6.0%, DAOY 11.6%, ONS76 21.5%. Questi risultati indicano come le UW228-1 e le ONS76 abbiano efficienza di trasfezione idonea

ai nostri scopi, mentre l'efficienza delle D283MED e delle DAOY risulta essere troppo bassa (Figura 11).

SENSIBILITÀ AL G418. Dalla ricerca, fatta su tutte le linee di MB prese in esame, della concentrazione di G418 più idonea per la selezione, è risultato che le UW228-1 raggiungono la mortalità totale dopo 9 giorni di coltura in terreno con G418 alla dose di 750 µg/mL; le D283MED muoiono dopo 11 giorni ad una dose di 1250 µg/mL; le DAOY muoiono completamente dopo 12 giorni alla dose di 250 µg/mL; mentre le ONS76 non risultano essere sensibili al G418. Da questi risultati si evince come per tutte le linee cellulari indagate, ad eccezione delle ONS76, il G418 possa essere utilizzato come agente selettivo.

LIVELLO D'ESPRESSIONE DI P53 TOTALE. Dall'analisi semiquantitativa dei livelli di espressione di p53 è emerso che, salvo le DAOY che la esprimono ad alti livelli indicando che la proteina non è funzionale, le altre linee di MB esprimono livelli basali di p53 (Figura 12), compatibile con la presenza di una p53 *wild-type*, caratteristica importante per la valutazione della risposta alle RI.

SCELTA DELLA LINEA CELLULARE PIÙ IDONEA ALLO STUDIO. Alla luce dei dati raccolti la linea UW228-1 è risultata la più adatta ai nostri scopi in quanto, oltre a presentare un'adeguata efficienza di trasfezione, si mostra responsiva al G418 e presenta una forma *wild-type* di p53.

1.3 TRASFEZIONE DELLE UW228-1 E ISOLAMENTO DEI CLONI

Effettuate le trasfezioni della linea UW228-1 con il plasmide d'interesse e il vettore vuoto, un'accurata osservazione al microscopio ottico ha permesso di selezionare ed espandere 7 colonie, verosimilmente cloni puri: 4 colonie trasfettate con il vettore pCl-neo/ β -cateninS33Y (UW-B 1, 2, 3 e 4); 3 di controllo trasfettate col vettore pCl-neo (UW-V 1, 2 e 4).

2. CARATTERIZZAZIONE DELLE LINEE DI MB CON WNT ATTIVATO

2.1 PRESENZA DEL TRANSGENE B-CATENIN S33Y

B-CATENINA PLASMIDICA. La reazione di PCR condotta con la coppia di primer specifici per gli esoni 3 e 4 di β -catenina ha dato i seguenti risultati: nelle colonie UW-V e nella linea UW228-1 è stata rilevata una sola banda di 635 bp relativa alla forma genomica di CTNNB1, mentre nella colonia UW-B 3 è stata rilevata una banda aggiuntiva di 435 bp, relativa ad un tratto di cDNA plasmidico più corto per assenza di introni (Figura 13a).

La seconda reazione di PCR con il primer di CMV, accoppiato a quello dell'esone 3 di β -catenina, ha fornito un amplificato solo dalla colonia UW-B 3 e nessun amplificato nelle UW-V e UW228-1, come da atteso. In particolare, è stata rilevata la presenza di un'unica banda di 572 bp (corrispondente alla sequenza del promotore di CMV più i primi 3 esoni di β -catenina) solo in corrispondenza della suddetta colonia e assenza totale di bande negli altri casi (Figura 13b). In funzione della presenza di β -catenina sono state quindi scelte le colonie, con cui procedere nelle successive indagini: UW-B 3 e UW-V 1.

B-CATENINA MUTATA. La terza coppia di primer ha mostrato la presenza della mutazione d'interesse nel clone prescelto di UW-B. In particolare, il clone UW-B 3 ha dato un amplificato di circa 375 bp, mentre le linee di controllo non hanno dato alcun risultato in quanto la presenza di CTNNB1 *wild-type* non consente al *primer forward* specifico per la mutazione S33Y di appaiarsi alla sequenza genomica e innescare la PCR (Figura 13c).

2.2 ESPRESSIONE E LOCALIZZAZIONE DI B-CATENINA

I LIVELLI PROTEICI NUCLEARI AUMENTANO IN SEGUITO ALLA TRASFEZIONE.

Dall'analisi WB, è stato evidenziato che i livelli di espressione di β -catenina nucleare nella linea cellulare UW-B aumentavano rispetto a UW-V e UW228-1, raggiungendo un picco a 28 ore dalla messa in coltura (Figura 14).

B-CATENINA LOCALIZZA A LIVELLO NUCLEARE IN UW-B. Nelle colonie sono state rilevate significative differenze relative all'immuno-positività per β -catenina; in particolare, nella colonia UW-B l'intensità del segnale risultava maggiore rispetto alla colonia di controllo UW-V. E' stata osservata inoltre una diversa compartimentalizzazione: nelle prime il segnale era localizzato principalmente a livello nucleare, nelle seconde si rilevava invece a livello perinucleare e a livello delle giunzioni intercellulari (Figura 15). Gli aspetti sopra descritti sono stati rilevati più nettamente nelle colonie UW-B 3 e UW-V 1, a conferma dei risultati della PCR.

2.3 ESPRESSIONE DEI GENI BERSAGLIO CICLINA D1 E MYC

I livelli di espressione totali di ciclina D1 e MYC, due proteine a valle del sistema WNT/ β -catenina, hanno mostrato un aumento in seguito al picco osservato alle 28 ore dalla pistratura di β -catenina nucleare. In particolare, ciclina D1 ha mostrato un aumento in UW-B rispetto a UW-V di 1.8 volte a 24-40 ore rispetto alla messa in coltura (Figura 16a), mentre MYC di 1.2 volte a 40-48 ore (Figura 16b).

3. LA RISPOSTA BIOLOGICA IN SEGUITO AD ATTIVAZIONE DEL SISTEMA WNT

3.1 ALTERAZIONI NELLA CRESCITA CELLULARE

Nella colonia UW-B è evidente una diminuzione della vitalità, rispetto alla linea di controllo UW-V, in normali condizioni di coltura. La presenza di beta-catenina nucleare risulta pertanto in un minore numero di cellule durante la fase di crescita esponenziale. Le analisi statistiche hanno mostrato che il numero di UW-B versus UW-V a 120 ore dalla messa in coltura (96 ore dalle RI, poiché il tempo 0 è il momento in cui è stata effettuata l'irradiazione dei campioni corrispondenti), è più basso del 12% ($p < 0.01$, RM ANOVA) (Figura 17).

Nei corrispettivi irradiati, le UW-V RI hanno mostrato una crescita rallentata, come atteso, rispetto alla loro controparte non irradiata; ad ogni modo, le UW-B RI crescevano significativamente meno di tutti gli altri cloni. A 96 ore dall'irradiazione, UW-B RI versus UW-B mostravano una diminuzione del numero di cellule del 37% ($p < 0.001$) e rispetto a UW-V RI del 15% ($p < 0.01$), dimostrando che la presenza di beta-catenina nucleare aumenta la radiosensibilità delle cellule di MB in vitro (Figura 17).

COMPARABILITÀ DELLE LINEE DI CONTROLLO. Nelle linee di controllo UW228-1 e UW-V è stato riscontrato un andamento del tutto sovrapponibile della crescita cellulare (Figura 19a).

3.2 AUMENTO DEL TASSO DI MORTALITÀ

I dati sulla crescita cellulare sono supportati da quelli sulla mortalità. In particolare la colonia UW-B 3 presentava a 72, 96 e 120 ore dalla piastratura (*time-points* corrispondenti a 48, 72 e

96 ore dalle RI), una mortalità rispettivamente del 19.97%, 14.3% e 13.58%. La colonia UW-V 1 mostrava invece, ai medesimi *time-points*, una mortalità del 9.8%, 8.53%, 8.98%. Le colonie irradiate hanno riproposto sostanzialmente le differenze: la colonia UW-B 3 RI raggiungeva una mortalità del 16.92%, 14.98% e 20.19%; mentre la colonia UW-V 1 RI presentava una percentuale di mortalità del 9.05%, 10.95% e 14.51%, rispettivamente a 48, 72 e 96 ore dalle RI (Figura 18).

A 72 ore dalla messa in coltura (48 ore dalle RI), UW-B avevano una percentuale di mortalità 2 volte più alta rispetto al linea di controllo UW-V ($p < 0.05$). Inoltre a 96 dalle RI, UW-B RI mostravano un aumento nella mortalità cellulare rispetto alla loro controparte non irradiata UW-B (7%, $p < 0.05$) e alla linea contenente il vettore vuoto UW-V, sia irradiata (6%, $p < 0.05$) che no (12%, $p < 0.001$) (Figura 18).

COMPARABILITÀ DELLE LINEE DI CONTROLLO. Anche in termini di mortalità, UW-V hanno mostrato un tasso di mortalità globalmente sovrapponibile a quello delle UW228-1 originarie (Figura 19b).

3.2 INIBIZIONE DELLA CAPACITÀ INVASIVA

Il test d'invasione attraverso membrana di Matrigel® in camera di Boyden ha mostrato che l'attivazione del sistema WNT inibisce la capacità invasiva delle cellule di MB umano: UW-B presentavano infatti una riduzione del numero di cellule in grado di attraversare la membrana di Matrigel® del 97,4%, rispetto ad entrambe le linee di controllo ($p < 0.0001$) (Figura 20).

COMPARABILITÀ DELLE LINEE DI CONTROLLO. La capacità invasiva di UW-V e UW228-1 si è mostrata perfettamente sovrapponibile (Figura 20).

3.3 ACCENNI DI DIFFERENZIAMENTO

ANALISI DELLA MORFOLOGIA CELLULARE. La linea UW228-1 di controllo risulta caratterizzata da tre tipologie cellulari: cellule

poligonali/ovali, cellule allungate/a mazza (unipolari, bipolari e multipolari) e cellule giganti [139]. Il controllo di trasfezione UW-V presenta una maggioranza di cellule allungate, con corti processi citoplasmatici uni e bi-polari (Figura 21c-d), mentre la linea di controllo presenta una predominanza di cellule poligonali (Figura 21b). Nelle cellule UW-B è possibile apprezzare un alterato rapporto tra il numero di cellule poligonali e cellule allungate a favore di quest'ultime (Figura 21a). Inoltre tali cellule, rispetto alle linee di controllo, presentano processi citoplasmatici lunghi e molto sottili, prevalentemente multipolari, e lunghe estensioni citoplasmatiche (Figura 21e-f).

ANALISI ULTRASTRUTTURA SUBCELLULARE. Nelle cellule sia trasfettate che di controllo si riscontrano le tipiche alterazioni neoplastiche: nucleo con profonde invaginazioni del nucleolemma che rendono ragione dell'irregolarità dei contorni nucleari, nucleolo ipertrofico, alterato numero dei mitocondri con aspetti degenerativi come la presenza di figure mieliniche. In particolare, si possono osservare due citotipi corrispondenti a quelli definiti al microscopio ottico:

- cellule a morfologia poligonale/ovale: ampio citoplasma, pochi microfilamenti e microtubuli distribuiti casualmente nella matrice ialoplasmatica (Figura 22a);
- cellule con morfologia allungata/a mazza: nucleo ovalare e numerosi microfilamenti frammisti a distinti microtubuli ad andamento parallelo all'interno dei prolungamenti citoplasmatici, indice di differenziamento cellulare (Figura 22b-e).

Il rapporto semiquantitativo tra i citotipi rappresentati è riconducibile a quello evidenziato in microscopia ottica (Figura 21a).

ESPRESSIONE DEI MARKER DI DIFFERENZIAMENTO. Nelle diverse linee cellulari è stata rilevata positività per i neurofilamenti ad alto

peso molecolare in tutte le tipologie cellulari. Questa si mostrava puntiforme a livello citoplasmatico, molto evidente nei prolungamenti cellulari e addensata a livello perinucleare (Figura 23). Anche i neurofilamenti a peso molecolare intermedio hanno mostrato una positività puntiforme, sovrapponibile a quella di NF-H. Rispetto a questo, però, il segnale ricadeva maggiormente nei prolungamenti e non si osservava un addensamento a livello perinucleare (Figura 23).

GFAP ha mostrato anch'essa un'espressione nelle varie tipologie cellulari a livello citoplasmatico, con addensamenti perinucleari e a livello dei prolungamenti (Figura 23). La compresenza di GFAP, teoricamente presente solo negli astrociti maturi, è un reperto comune in cellule derivate da tumori embrionali (nel GBM NF oltre a GFAP, nel MB GFAP oltre a NF).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

C'è grande consenso nel ritenere che dall'implementazione delle conoscenze sulla biologia del MB, sui meccanismi molecolari implicati nella patogenesi e nella risposta alle terapie, ad oggi non ancora completamente elucidate, possa derivare un miglioramento del *management* clinico del paziente. L'obiettivo primario da raggiungere è quello di introdurre nuovi fattori prognostici che tengano conto anche del profilo molecolare del tumore, al fine di migliorare la stratificazione del rischio che al momento risulta altamente imprecisa, e di ridurre il più possibile le dosi di RI senza andare però ad inficiare l'efficacia del trattamento [9]. Inoltre una più ampia conoscenza dei meccanismi sottostanti il tumore consentirebbe di sviluppare terapie individualizzate che combinino trattamenti convenzionali ad approcci innovativi mirati a precisi bersagli molecolari [9,107]. Essendo il MB una neoplasia estremamente eterogenea, sia dal punto vista istopatologico che genetico-molecolare, l'esito dei trattamenti è anche tumore-specifico: le diverse varianti hanno infatti non solo istogenesi e patogenesi, ma anche risposta alla terapia, diverse [4,18]. Recenti studi di aCGH, SNP, CNV e profili di espressione di mRNA e miRNA si sono concentrati nell'associare un profilo molecolare a *cluster* di MB specifici, correlandoli ad aspetti demografici, clinici, genetici e trascrizionali. E' risultato che un sottogruppo di tumori con attivazione del sistema molecolare WNT/ β -catenina, è associato a prognosi migliore rispetto agli altri sottogruppi. La nucleopositività per β -catenina, indicativa di attivazione del sistema WNT, correla con un significativo

miglioramento sia dell'OS che dell'EFS. Rimane tuttavia da chiarire se l'attivazione del sistema WNT sia legata ad un fenotipo meno aggressivo o se conferisca maggiore suscettibilità ai trattamenti [92].

A questo scopo è stato allestito un studio di *gain of function*, che riproducesse, mediante un modello sperimentale *in vitro* adeguato, la condizione di MB umano con WNT attivo. È stato quindi utilizzato per la creazione di tale modello il vettore plasmidico pCI-neo/ β -cateninS33Y, contenente l'intera sequenza di cDNA codificante per β -catenina mutata e non degradabile. Tra diverse linee cellulari di MB umano (UW228-1, D283MED, DAOY e ONS76) a disposizione, la linea UW228-1 è stata l'unica a presentare le caratteristiche idonee al nostro modello sperimentale. Infatti oltre a presentare buona efficienza di trasfezione del plasmide in questione e sensibilità all'antibiotico G418, agente selettivo analogo della neomicina utilizzato per selezione ed il mantenimento della trasfezione stabile, questa linea possiede p53 in forma *wild-type*, caratteristica comune al 90% dei MB. La rilevazione dello *status* di p53 è importante al fine di valutare la risposta al danno genotossico indotto dalle RI, dato il ruolo cruciale di questo oncosoppressore nel dirigere il destino delle cellule in tali condizioni. La trasfezione mediante lipidi cationici (nel nostro caso lipofectamina) del plasmide pCI-neo/ β -cateninS33Y nella linea di MB umano UW228-1 ha dato origine a diversi cloni cellulari (UW-B). Inoltre come linea di controllo per la trasfezione, sono stati ottenuti altri cloni di UW228-1 trasfettati però con il vettore vuoto pCI-neo, privo della sequenza del transgene d'interesse (UW-V). Le diverse linee ottenute dalla trasfezione sono state poste sotto la selezione permanente del G418, antibiotico in grado di uccidere l'intera popolazione cellulare UW228-1 non trasfettata, ma non le cellule che hanno acquisito, mediante l'incorporamento del plasmide, la resistenza ad esso.

I cloni così ottenuti sono stati caratterizzati da un punto di vista molecolare ed il clone UW-B 3 ha mostrato presenza della sequenza plasmidica di β -catenina e presenza della mutazione specifica di nostro interesse. In questo clone sono stati rilevati livelli proteici di β -catenina nucleare maggiori che in UW-V 1 e nella linea originaria UW228-1 ed una forte immunoreattività per questa proteina a livello nucleare. Inoltre è stata osservata l'aumentata espressione dei geni bersaglio della via di segnalazione canonica WNT/ β -catenina, quali ciclina D1 e MYC, ad ore successive rispetto all'aumento di β -catenina nucleare. Questi dati confermano l'attivazione del sistema WNT nei cloni UW-B e UW-V prescelti, in quanto la presenza di alti livelli nucleari di β -catenina è ampiamente ritenuta in letteratura indicativa dell'attivazione del *pathway* canonico. Inoltre β -catenina è stata dimostrata essere funzionale all'interno del nucleo dall'aumentata espressione dei geni bersaglio ciclina D1 e MYC.

Pertanto il modello sperimentale ottenuto è risultato essere idoneo allo studio e si è indagato sugli effetti biologici dovuti all'attivazione del sistema WNT e l'influenza di quest'ultima nella risposta alle RI. In particolare UW-B e UW-V sono stati confrontati in termini di crescita e mortalità, valutando contestualmente il loro andamento sia dopo trattamento radioterapico che non. Il primo aspetto che abbiamo rilevato è stato che la crescita cellulare della colonia UW-B era significativamente inferiore a quella di UW-V e si può pertanto asserire che l'attivazione del sistema WNT rallenta la crescita cellulare. Sebbene coi limiti intrinseci ad uno studio *in vitro* emerge questo importante dato che, dal punto di vista biologico, avvalorava l'ipotesi, avanzata in letteratura, secondo cui l'attivazione del sistema WNT renderebbe il fenotipo tumorale meno aggressivo. Valutando la risposta alle RI entrambe le linee irradiate mostravano, come atteso, una crescita significativamente ridotta rispetto alle controparti non irradiate. Tuttavia la colonia UW-B RI risulta nettamente svantaggiata nella crescita cellulare,

rispetto a tutte le altre linee. L'osservazione di una crescita sensibilmente inferiore di UW-B RI rispetto alla sua controparte non irradiata UW-B, avvalorata inoltre il contributo dell'attivazione di WNT alla radiosensibilità. E' stato osservato che UW-B ha una mortalità più alta, a 72 ore dalla piastratura, rispetto alle colonie UW-V. Questo aumento è attribuibile all'attivazione del sistema WNT e corrobora i precedenti dati di crescita cellulare. E' quindi verosimile supporre che β -catenina selezionazioni di per sé un fenotipo cellulare meno aggressivo. A 96 ore dalle RI, c'è peraltro un aumento statisticamente significativo della mortalità di UW-B RI sia rispetto a UW-B che a UW-V, RI e non. Quest'ultimo dato depone a favore della capacità del sistema WNT di conferire al tumore una maggiore radiosensibilità. Inoltre è stato osservato che la linea UW-V mostra un andamento del tutto sovrapponibile a quello della linea UW228-1 originaria, sia in termini di crescita che di mortalità, il che è importante perché ci consente di attribuire eventuali differenze alla presenza del nostro transgene e non alla tecnica di manipolazione genetica in sé. A contribuire alla descrizione di un fenotipo meno aggressivo in seguito all'attivazione del WNT, i dati sulla capacità invasiva delle linee in studio hanno mostrato una drastica riduzione delle cellule in grado di invadere attraverso una membrana di Matrigel nel clone UW-B, sia rispetto ai controlli UW-V che UW228-1. Tale risultato rispecchia l'associazione osservata in clinica per la quale i pazienti, appartenenti al sottogruppo molecolare di MB con WNT attivato, non presentano metastasi al momento della diagnosi, situazione invece riscontrata di frequente negli altri casi di MB. Il comportamento meno aggressivo osservato in seguito all'attivazione del WNT ci ha fatto ipotizzare un possibile differenziamento in senso neuronale. La microscopia ottica ha evidenziato nella linea UW-B un'alterata distribuzione dei fenotipi cellulari riscontrati solitamente nella linea UW228-1. Le UW-B tendevano infatti ad avere una preponderanza di cellule allungate, con processi cellulari uni-, bi- e multi-polari e la

presenza di lunghe estensioni citoplasmatiche, a differenza di quanto osservato nelle linee di controllo. I dati di microscopia elettronica hanno avvalorato l'ipotesi del differenziamento in senso neuronale: in particolare le cellule con morfologia allungata/a mazza presentavano una disposizione ordinata sia di microtubuli che di filamenti intermedi rispetto alle cellule con morfologia poligonale ovale. L'espressione degli antigeni neuronali ha mostrato come i filamenti intermedi osservati in microscopia elettronica siano verosimilmente neurofilamenti, indice di differenziamento in senso neuronale. Incrociando i dati ottenuti è possibile dedurre che le UW-B presentano verosimilmente un elevato numero di cellule di forma allungata spinte verso il differenziamento neuronale.

Sebbene siano necessari ulteriori studi, sia *in vitro*, al fine di determinare altri aspetti del MB con attivazione del sistema WNT, che *in vivo* per assicurare che tali effetti si verificano anche sulla massa tumorale, sono state per la prima volta fornite alcune spiegazioni biologiche circa il ruolo prognostico positivo di β -catenina nucleare. L'attivazione del sistema WNT nel MB umano sembra pertanto portare ad un fenotipo cellulare meno aggressivo, caratterizzato da una crescita rallentata, maggiore mortalità percentuale, perdita della capacità invasiva e accenno al differenziamento in senso neuronale. Inoltre in risposta alle RI, l'attivazione del sistema porta ad una aumentata radiosensibilità delle cellule di MB umano, sia in termini di minore crescita che di maggiore mortalità. Questi dati offrono un'ulteriore motivazione ad utilizzare la valutazione dell'immunopositività di β -catenina a livello nucleare nella diagnostica di routine del MB. Inoltre, viene fornito un forte razionale per approfondire l'argomento visto che all'attivazione del sistema WNT può essere attribuito valore predittivo, oltre che prognostico, e ciò avrebbe un grande impatto nel *management* clinico dei pazienti con MB.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Bailey P, Cushing H. A common type of midcerebellar glioma of childhood. *Arch Neurol Psychiatr.* 14:192-224, 1925
- [2] Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K, Giordano A. Medulloblastoma: From molecular pathology to therapy. *Clin Cancer Res.* 14(4): 971-976, 2008
- [3] Eberhart CG, Kepner JL, Goldthwaite PT, Kun LE, Duffner PK, Friedman HS, Strother DR, Burger PC. Histopathologic grading of medulloblastomas: a pediatric oncology group study. *Cancer.* 94:552-560, 2002
- [4] 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
- [5] Ellison DW. Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropath Appl Neurobiol.* 28:257-282, 2002
- [6] Halperin EC, Friedman HS. Is there a correlation between duration of presenting symptoms and stage of medulloblastoma at the time of diagnosis? *Cancer.* 78:874-880, 1996
- [7] Ang C, Hauerstock D, Guiot MC, Kasymjanova G, Roberge D, Kavan P, Muanza T. Characteristics and outcomes of medulloblastoma in adults. *Pediatr Blood Cancer.* 51:603-607, 2008

- [8] Crawford JR, MacDonald TJ, Packer RJ. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol.* 6:1073-1085, 2007
- [9] Gilbertson RJ. Medulloblastoma: signaling a change in treatment. *Lancet Oncol.* 5:209-218, 2004
- [10] Massimino M, Giangaspero F, Garre ML, Gandola L, Poggi G, Biassoni V, Gatta G, Rutkowski S. Childhood medulloblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* [Epub ahead of print] 2010
- [11] 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.
- [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] Brat DJ, Parisi JE, Kleinschmidt-DeMasters BK, Yachins AT, Montine TJ, Boyer PJ, Powell SZ, Prayson RA, McLendon RE. A review of changes introduced by the 2007 WHO classification of tumors of the nervous system, 4th edition. *Arch Pathol Lab Med.* 132:993-1007, 2008
- [14] Mueller S, Chang S. Pediatric Brain Tumors: Current treatment strategies and future therapeutic approaches. *Neurotherapeutics.* 6:570-586, 2009
- [15] Jozwiak J, Grajkowska W, Wlodarski P. Pathogenesis of medulloblastoma and current treatment outlook. *Med Res Rev.* 27:869-890, 2006
- [16] Boon K, Eberhart CG, Riggins GJ. Genomic amplification of orthodenticle homologue 2 in medulloblastomas. *Cancer Res.* 65:703-707, 2005

- [17] Schuller U, Heine VM, Mao J, Kho AT, Dillon AK, Han YG, Huillard E, Sun T, Ligon AH, Qian Y, Ma Q, varez-Buylla A, McMahon AP, Rowitch DH, Ligon KL. Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell*. 14:123-134, 2008
- [18] 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
- [19] Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currle DS, Eden C, Kranenburg TA, Hogg T, Poppleton H, Martin J, Finkelstein D, Pounds S, Weiss A, Patay Z, Scoggins M, Ogg R, Pei Y, Yang ZJ, Brun S, Lee Y, Zindy F, Lindsey JC, Taketo MM, Boop FA, Sanford RA, Gajjar A, Clifford SC, Roussel MF, McKinnon PJ, Gutmann DH, Ellison DW, Wechsler-Reya R, Gilbertson RJ. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*. 468:1095-1099, 2010
- [20] 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
- [21] Gulino A., Arcella A., Giangaspero F. Pathological and molecular heterogeneity of medulloblastoma. *Curr Opin Oncol*. 20:668-675, 2008
- [22] Marino S. Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med*. 11:17-22, 2005

- [23] Guessous F, Li Y, Abounader R. Signaling pathways in Medulloblastoma. *J Cell Physiol.* 217:577-583, 2008
- [24] 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
- [25] 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, Kinzler KW. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med.* 332:839-847, 1995
- [26] Caro I, Low J. The role of the hedgehog signaling pathway in the development of basal cell carcinoma and opportunities for treatment. *Clin Cancer Res.* 16:3335-3339, 2010
- [27] Garre ML, Cama A, Bagnasco F, Morana G, Giangaspero F, Brisigotti M, Gambini C, Forni M, Rossi A, Haupt R, Nozza P, Barra S, Piatelli G, Viglizzo G, Capra V, Bruno W, Pastorino L, Massimino M, Tumolo M, Fidani P, Dallorso S, Schumacher RF, Milanaccio C, Pietsch T. Medulloblastoma variants: age-dependent occurrence and relation to Gorlin syndrome--a new clinical perspective. *Clin Cancer Res.* 15:2463-2471, 2009
- [28] Palmero EI, Achatz MI, Shton-Prolla P, Olivier M, Hainaut P. Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome. *Curr Opin Oncol.* 22:64-69, 2010
- [29] Roelfsema JH, Peters Dorien JM. Rubinstein-Taybi syndrome: clinical and molecular overview. *Expert Reviews Molecular Medicine.* 9:1-16, 2007

- [30] Griffin CA, Hawkins AL, Packer RJ, Rorke LB, Emanuel BS. Chromosome abnormalities in pediatric brain tumors. *Cancer Res.* 48:175-180, 1988
- [31] Reardon DA, Michalkiewicz E, Boyett JM, Sublett JE, Entekin RE, Ragsdale ST, Valentine MB, Behm FG, Li H, Heideman RL, Kun LE, Shapiro DN, Look AT. Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 57:4042-4047, 1997
- [32] Biegel JA, Rorke LB, Packer RJ, Sutton LN, Schut L, Bonner K, Emanuel BS. Isochromosome 17q in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Genes Chromosomes Cancer.* 1:139-147, 1989
- [33] Pietsch T, Taylor MD, Rutka J. Molecular pathogenesis of childhood brain tumors. *J Neurooncol.* 70:203-215, 2004
- [34] Frank A.J, 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
- [35] Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, Langdon JA, Gilbertson RJ, Straughton D, Ellison DW. Wnt/Wingless Pathway Activation and Chromosome 6 Loss Characterize a Distinct Molecular Sub-Group of Medulloblastomas Associated with a Favorable Prognosis. *Cell Cycle.* 5:2666-2670, 2006
- [36] Pan E, Pellarin M, Holmes E, Smirnov I, Misra A, Eberhart CG, Burger PC, Biegel JA, Feuerstein BG. Isochromosome 17q is a negative prognostic factor in poor-risk childhood medulloblastoma patients. *Clin Cancer Res.* 11:4733-4740, 2005
- [37] 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

[38] Jay V, Squire J, Bayani J, Alkhani AM, Rutka JT, Zielenska M. Oncogene amplification in medulloblastoma: analysis of case by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Pathology.* 31:337-344, 1999

[39] Brown HG, Kepner JL, Perlman EJ, Friedman HS, Strother DR, Duffner PK, Kun LE, Goldthwaite PT, Burger PC. "Large cell/anaplastic" medulloblastomas: a pediatric oncology group study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59:857-865, 2000.

[40] von Bueren AO, Shalaby T, Oehler-Jänne C, Arnold L, Stearns D, Eberhart CG, Arcaro A, Pruschy M, Grotzer MA. RNA interference-mediated c-MYC inhibition prevents cell growth and decreases sensitivity to radio- and chemotherapy in childhood medulloblastoma cells. *BMC Cancer.* 9:10, 2009

[41] Lo KC, Ma C, Bundy BN, Pomeroy SL, Eberhart CG, Cowell JK. Gain of 1q is a potential univariate negative prognostic marker for survival in medulloblastoma. *Clin Cancer Res.* 13:7022-7028, 2007

[42] De Bortoli M, Castellino RC, Lu X, Deyo J, Sturla LM, Adesina AM, Perlaky L, Pomeroy SL, Lau CC, Ma T, Rao PH, Kim JYH. Medulloblastoma outcome is adversely associated with overexpression of EEF1D, RPL30 and RPS20 on the long arm of chromosome 8. *BMC Cancer.* 6:223, 2006

[43] Parathath SR, Mainwaring LA, Fernandez LA, Campbell DO, Kenney AM. Insulin receptor substrate 1 is an effector of sonic hedgehog mitogenic signalling in cerebellar neural precursors. *Development.* 135:3291-3300, 2008

[44] Corcoran RB, Raveh TB, Barakat MT, Lee EY, Scott MP. Insulin-like Growth Factor 2 is required for progression to

advanced Medulloblastoma in patched 1 heterozygous mice. *Cancer Res.* 68:8788-8795, 2008

[45] Zweidler-McKay PA. Notch signaling in pediatric malignancies. *Curr Oncol Rep.* 10:459-468, 2008

[46] Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li Y-M, Eberhart CG. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res.* 66:7445-7452, 2006

[47] Fox V, Gokhaele PJ, Walsh JR, Matin M, Jones M, Andrews PW. Cell-Cell signalling through NOTCH regulates human embryonic stem cell proliferation. *Stem Cells.* 26:715-723, 2008

[48] Koch U, Radtke F. Notch and Cancer: a double-edged sword. *Cell Mol life Sci.* 64:2746-2762, 2007

[49] Hallahan AR, Pritchard JI, Hansen S, Benson M, Stoeck J, Hatton BA, Russell TL, Ellenbogen RG, Bernstein ID, Beachy PA, Olson JM. The SmoA1 mouse model reveals that Notch signaling is critical for the growth and survival of Sonic Hedgehog-induced Medulloblastomas. *Cancer Res.* 64:7794-7800, 2004

[50] Garzia L, Andolfo I, Cusanelli E, Marin N, Petrosino G, De Martino D, Esposito V, Galeone A, Navaso L, Esposito S, Garguilo S, Fattet S, Donofrio V, Cinalli G, Brunetti A, Del Vecchio L, Northcott PA, Delattre O, Taylor MD, Iolascon A, Zollo M. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in Medulloblastoma. *PLoS One.* 4:e4998, 2009

[51] Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, Ni XZ, Wang Y, Ball D, Brat DJ, Perry A, Eberhart CG. Notch 1 and Notch 2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res.* 64:7787-7793, 2004

[52] Schreck KC, Taylor P, Marchionni L, Gopalakrishnan V, Bar EE, Gaiano N, Eberhart CG. The Notch target Hes1 directly

modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance. *Clin Cancer Res.* 16:6060-6070, 2010

[53] Gajjar A, Hernan R, Kocak M, Fuller C, Lee Y, McKinnon PJ, Wallace D, Lau C, Chintagumpala M, Ashley DM, Kellie SJ, Kun L, Gilbertson RJ. Clinical, histopathologic, and molecular markers of prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 22:984-993, 2004

[54] Gilbertson R, Clifford SC, MacMeekin W, Wright C, Perry RH, Kelly P, Pearson ADJ, Lunee J. Expression of the ErbB-Neuregulin signalling network during human cerebellar development: implications for the biology of Medulloblastoma. *Cancer Res.* 58:3932-3941, 1998

[55] Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 21:177-184, 2009

[56] Zeng N, Liu L, McCabe MG, Jones DTW, Ichimura K, Collins VP. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis with fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes reveals differential expression of the four ERBB4 juxtamembrane region variants between medulloblastoma and pilocytic astrocytoma. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 35:353-366, 2009

[57] Li Y, Guessous F, Johnson EB, Eberhart CG, Li X, Shu Q, Fan S, Lal B, Laterra J, Schiff D, Abounader R. Functional and molecular interactions between the HGF/c-met pathway and c-myc in large cell medulloblastoma. *Lab Invest.* 88:98-111, 2008

[58] 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

[59] Gudkov AV, Komarova EA. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer.* 3:117-129, 2003

- [60] Willers H, Dahm-Daphi J, Powell SN. Repair of radiation damage to DNA. *Br J Cancer*. 90:1297-1301, 2004
- [61] 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
- [62] 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
- [63] Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res*. 56:892-898, 1996
- [64] Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer Res*. 61:513-516, 2001
- [65] 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
- [66] 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
- [67] 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
- [68] Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, Stiles CD, Pomeroy SL. Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a

favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91:12867-1271, 1994

[69] Ohta T, Watanabe T, Katayama Y, Kurihara J, Yoshino A, Nishimoto H, Kishimoto H. TrkA expression is associated with an elevated level of apoptosis in classic medulloblastomas. *Neuropathology.* 26:170-177, 2006

[70] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 358:1148-1159, 2008

[71] Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* 301:89-92, 1983

[72] Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet.* 48:880-888, 1991

[73] Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.* 55:4531-4535, 1995

[74] Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setien F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 67:1424-1429, 2007

[75] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403:41-45, 2000

[76] Wiencke JK, Zheng S, Morrison Z, Yeh RF. Differentially expressed genes are marked by histone 3 lysine 9 trimethylation in human cancer cells. *Oncogene.* 27:2412-2421, 2008

- [77] Northcott PA, Nakahara Y, Wu X, Feuk L, Ellison DW, Croul S, Mack S, Kongkham PN, Peacock J, Dubuc A, Ra YS, Zilberberg K, McLeod J, Scherer SW, Sunil RJ, Eberhart CG, Grajkowska W, Gillespie Y, Lach B, Grundy R, Pollack IF, Hamilton RL, Van MT, Carlotti CG, Boop F, Bigner D, Gilbertson RJ, Rutka JT, Taylor MD. Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nat Genet.* 41:465-472, 2009
- [78] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 128:683-692, 2007
- [79] Shimokawa T, Svard J, Heby-Henricson K, Teglund S, Toftgard R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of first exon variants of the tumor-suppressor *Patched1* in Hedgehog signaling. *Oncogene.* 26:4889-4896, 2007
- [80] Diede SJ, Guenthoer J, Geng LN, Mahoney SE, Marotta M, Olson JM, Tanaka H, Tapscott SJ. DNA methylation of developmental genes in pediatric medulloblastomas identified by denaturation analysis of methylation differences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:234-239, 2010
- [81] Eberhart CG. Molecular diagnostics in embryonal brain tumors. *Brain Pathol.* 21:96-104, 2011
- [82] Pfister SM, Korshunov A, Kool M, Hasselblatt M, Eberhart C, Taylor MD. Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors. *Acta Neuropathol.* 120:553-566, 2010
- [83] MacDonald TJ, Brown KM, LaFleur B, Peterson K, Lawlor C, Chen Y, Packer RJ, Cogen P, Stephan DA. Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. *Nat Genet.* 29:143-152, 2001

- [84] Mendrzyk F, Radlwimmer B, Joos S, Kokocinski F, Benner A, Stange DE, Neben K, Fiegler H, Carter NP, Reifenberger G, Korshunov A, Lichter P. Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 23:8853-8862, 2005
- [85] Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, Chintagumpala M, Adesina A, Ashley DM, Kellie SJ, Taylor MD, Curran T, Gajjar A, Gilbertson RJ. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol.* 24:1924-1931, 2006
- [86] Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van SP, Troost D, Meeteren NS, Caron HN, Cloos J, Mrcic A, Ylstra B, Grajkowska W, Hartmann W, Pietsch T, Ellison D, Clifford SC, Versteeg R. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One.* 3:e3088, 2008
- [87] Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, Bouffet E, Clifford SC, Hawkins CE, French P, Rutka JT, Pfister S, Taylor MD. Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants. *J Clin Oncol.* [Epub ahead of print] 2010
- [88] Fernandez L, Northcott PA, Dalton J, Fraga C, Ellison D, Angers S, Taylor MD, Kenney AM. YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. *Genes Dev.* 23:2729-2741, 2009
- [89] Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H, Berhoukim R, Amani V, Goumnerova L, Eberhart CG, Lau CC, Olson JM, Gilbertson RJ, Gajjar A, Delattre O, Kool M, Ligon K, Meyerson M, Mesirov JP, Pomeroy SL. Integrative Genomic Analysis of Medulloblastoma Identifies a Molecular

Subgroup That Drives Poor Clinical Outcome. *J Clin Oncol.* [Epub ahead of print] 2010

[90] Chang CH, Housepian EM, Herbert Cjr. An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas. *Radiology.* 93:1351-69, 1969

[91] 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

[92] 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.* 23:7915-7, 2005

[93] 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

[94] 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

[95] 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

[96] Nakasu S, Nakasu Y, Nioka H, Nakajima M, Handa J. bcl-2 protein expression in tumors of the central nervous system. *Acta neuropathol.* 88:520-526, 2006

- [97] Viana-Pereira M, Almeida I, Sousa S, Mahler-Araújo B, Seruca R, Pimentel J, Reis RM. Analysis of micro satellite instability in medulloblastoma. *Neuro Oncol.* 11:458-467, 2009
- [98] 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
- [99] Rogers HA, Miller S, Lowe J, Brundler MA, Coyle B, Grundy RG. An investigation of WNT pathway activation and association with survival in central nervous system primitive neuroectodermal tumours (CNS PNET). *Br J Cancer.* 100:1292-1302, 2008
- [100] Momota H, Shih AH, Edgar MA, Holland EC. C-Myc and β -catenin cooperate with loss of p-53 to generate multiple members of the primitive neuroectodermal tumor family in mice. *Oncogene.* 27:4392-4401, 2008
- [101] Ellison DW. Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathol.* 120:305-316, 2010
- [102] Saury JM, Emanuelson I. Cognitive consequences of the treatment of medulloblastoma among children. *Pediatr Neurol.* 44:21-30, 2011
- [103] Frange P, Alapetite C, Gaboriaud G, Bours D, Zucker JM, Zerah M, Brisse H, Chevignard M, Mosseri V, Bouffet E, Doz F. From childhood to adulthood: long-term outcome of medulloblastoma patients. The Institut Curie experience (1980-2000). *J Neurooncol.* 95:271-279, 2009
- [104] Fossati P, Ricardi U, Orecchia R. Pediatric Medulloblastoma: toxicity of current treatment and potential role of protontherapy. *Cancer Treat Rev.* 35:79-96, 2009

- [105]Yasuda K, Taguchi H, Sawamura Y, Ikeda J, Aoyama H, Fujieda K, Ishii N, Kashiwamura M, Iwasaki Y, Shirato H. Low-dose craniospinal irradiation and isofosfamide, cisplatin and etoposide for non-metastatic embryonal tumours in the central nervous system. *Jpn J Clin Oncol.* 38:486-492, 2008
- [106]Ochs JS. Rationale and clinical basis for combining gefitinib (IRESSA, ZD1839) with radiation therapy for solid tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58:941-949, 2004
- [107]Ronchi A, Salaroli R, Rivetti S, Della Bella E, Di Tomaso T, Voltattorni M, Cammelli S, Ceccarelli C, Giangaspero F, Barbieri E, Cenacchi G. Lithium induces mortality in medulloblastoma cell lines. *Int J Oncol.* 37:745-52, 2010
- [108]Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:781-810, 2004
- [109]Nusse R. An ancient cluster of Wnt paralogues. *Trends Genet.* 17:443, 2001
- [110]Dubois L, Lecourtois M, Alexandre C, Hirst E, Vicent JP. Regulated endocytic routing modulates wingless signaling in *Drosophila* embryo. *Cell.* 105:613-624, 2001
- [111]Miller JR. The Wnts. *Genome Biol.* 3:1-15, 2001
- [112]Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci.* 119:395-402, 2006
- [113]Nelson JW, Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin and Cadherin Pathways. *Science.* 303:1483-1487, 2004
- [114]Lee MS, D'Amour KA, Papkoff J. A yeast model for functional analysis of β -catenin signaling. *J Cell Biol.* 158:1067-1078, 2002
- [115]Van Leeuwen IM, Byrne HM, Jensen OE, King JR. Elucidating the interactions between the adhesive and transcriptional functions

of β -catenin in normal and cancerous cells. *J Theor Biol.* 247:77-102, 2007

[116]Stadeli R, Hoffmans R, Basler K. Transcription under the control of nuclear Arm/ β -catenin. *Curr Biol.* 16:R378-R385, 2006

[117]Yamaguchi TP. Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol.* 11:R713-R724, 2001

[118]Mosimann C, Hausmann G, Basler K. β -catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:276-286, 2009

[119]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

[120]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

[121]Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation.* 10:431-442, 2003

[122]Zhang XP, Liu F, Cheng Z, Wang W. Cell fate decision mediated by p53 pulses. *PNAS.* 106:12245-12250, 2009

[123]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

[124]Gurung A, Uddin F, Hill RP, Ferguson PC, Alman BA. β -catenin is a mediator of the response of fibroblast to irradiation. *A J P.* 74:248-255, 2009

- [125] Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *PNAS*. 104:618-623, 2007
- [126] Salaroli R, Di Tomaso T, Ronchi A, Ceccarelli C, Cammelli S, Cappellini A, Martinelli GN, Barbieri E, Giangaspero F, Cenacchi G. Radiobiologic response of Medulloblastoma cell lines: involvement of β -catenin? *J Neurooncol*. 90:243-251, 2008
- [127] Nollet F, Berx G, Molemans F, Van Roy F. Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1). *Genomics*. 32:413-424, 1996
- [128] Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology*. 22:303-309, 2007
- [129] 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
- [130] Gumbiner BM. Regulation of Cadherin adhesive activity. *J Cell Biol*. 148:399-404, 2000
- [131] 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
- [132] Morin PJ. β -catenin signaling and cancer. *BioEssay*. 21:1021-1030, 1999
- [133] Huang H, Mahler-Araujo BM, Sankila A, Chimelli L, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol*. 156:433-437, 2000
- [134] Nikuseva Martić T, Pećina-Slaus N, Kusec V, Kokotović T, Musinović H, Tomas D, Zeljko M. AXIN-1 and beta-catenin in neuroepithelial brain tumors. *Pathol Oncol Res*. 16:75-79, 2010

- [135] Koch A, Hrychyk A, Hartmann W, Waha A, Mikeska T, Waha A, Schüller U, Sörensen N, Berthold F, Goodyer CG, Wiestler OD, Birchmeier W, Behrens J, Pietsch T. Mutations of the Wnt antagonist AXIN2 (Conductin) result in TCF-dependent transcription in medulloblastomas. *Int J Cancer*. 121:284-291, 2007
- [136] Koch A, Waha A, Tonn JC, Sörensen N, Berthold F, Wolter M, Reifenberger J, Hartmann W, Friedl W, Reifenberger G, Wiestler OD, Pietsch T. Somatic Mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors. *Int J Cancer*. 93:445-449, 2001
- [137] Belka C. The fate of irradiated tumor cells. *Oncogene*. 25:969-971, 2006
- [138] Liang SH, Clarke MF. Regulation of p 53 localization. *Eur J Biochem*. 268:2779-2783, 2001
- [139] Keles GE, Berger MS, Srinivasan J, Kolstoe DD, Bobola MS, Silber JR. Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines. *Oncol Res*. 7:493-503, 1995
- [140] Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM. Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 44:472-85, 1985
- [141] Peyrl A, Krapfenbauer K, Slavc I, Yang J, Strobel T, Lubec G. Protein profiles of medulloblastoma cell lines DAOY and D283: identification of tumor-related proteins and principles. *Proteomics*. 3:1781-1800, 2003
- [142] Koch A, Denkhaus D, Albretch S, Leuschener I, Schweinitz D, Pietsch T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the β -catenin gene. *Canc Res*. 59:269-273, 1999

ICONOGRAFIA

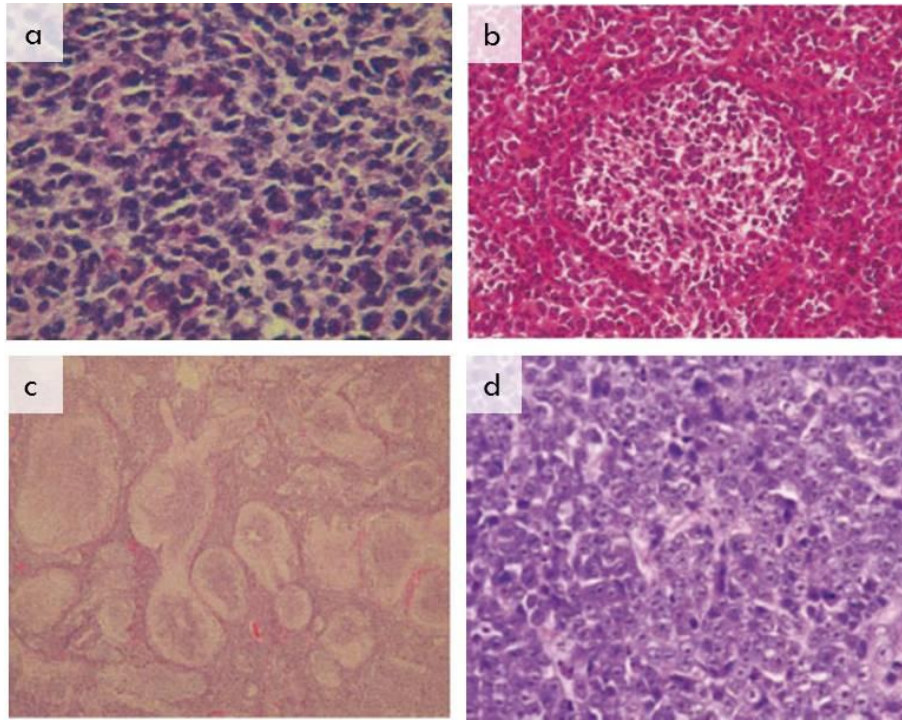


FIGURA 1. Varianti istopatologiche di medulloblastoma: a) MB classico; b) MB desmoplastico/nodulare; c) MB ad estesa nodularità; d) MB a grandi cellule/anaplastico. Riprodotta da Ellison DW. *Neuropath Appl Neurobiol* (2002)

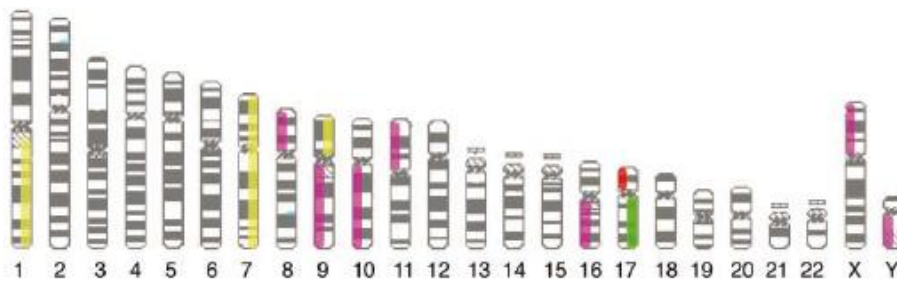


FIGURA 2. Ideogramma rappresentativo delle più comuni perdite o acquisizioni cromosomiche nel MB. Le perdite sono segnate in viola/rosso a sinistra dei cromosomi (viola: >25% perdita in

>15% di MB; rosso: >25% perdita in >25% di MB) e le acquisizioni in giallo/verde a destra dei cromosomi (giallo: >25% acquisizione in >15% di MB; verde: >25% acquisizione in >25% di MB). L'amplificazione dei geni MYC e MYCN è contrassegnata da una piccola barra turchese sul braccio lungo del cromosoma 8 e sul braccio corto del cromosoma 2, rispettivamente. Riprodotta da Ellison DW. *Neuropath Appl Neurobiol* (2002)

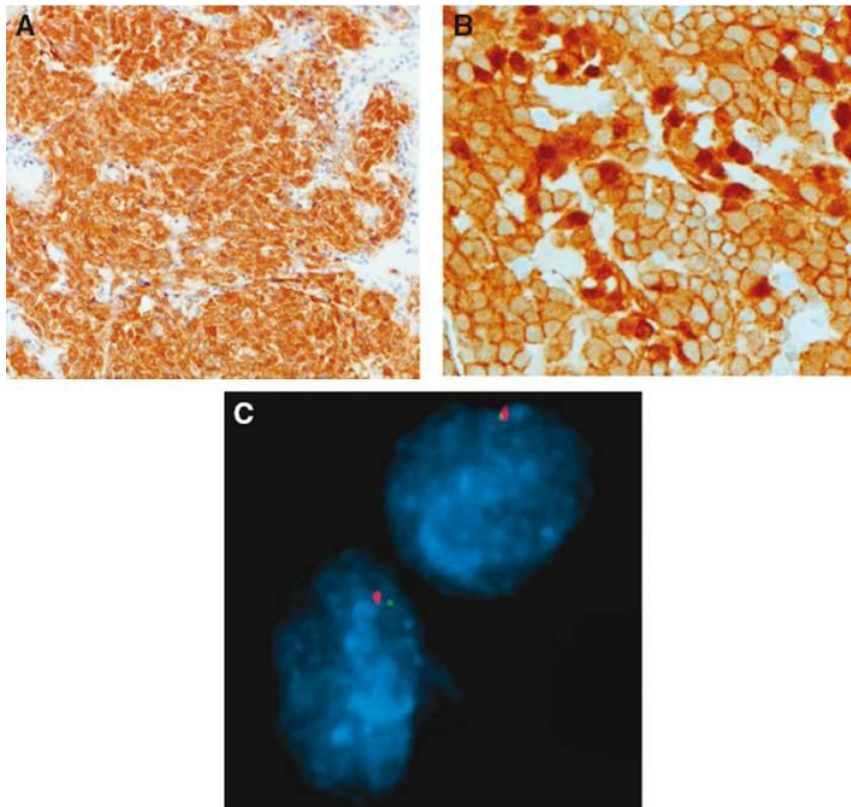


FIGURA 3. a) Immunopositività per β -catenina diffusa a livello nucleare e citoplasmatico nei MB del gruppo WNT; b) la nucleopositività irregolare per β -catenina caratterizza questo sottogruppo di MB, che contengono mutazioni in CTNNB1; c) l'ibridazione in situ a fluorescenza (FISH) dei nuclei in interfase mostra la monosomia del cromosoma 6 nel MB. Riprodotta da Ellison DW, et al. *J Clin Oncol* (2010)

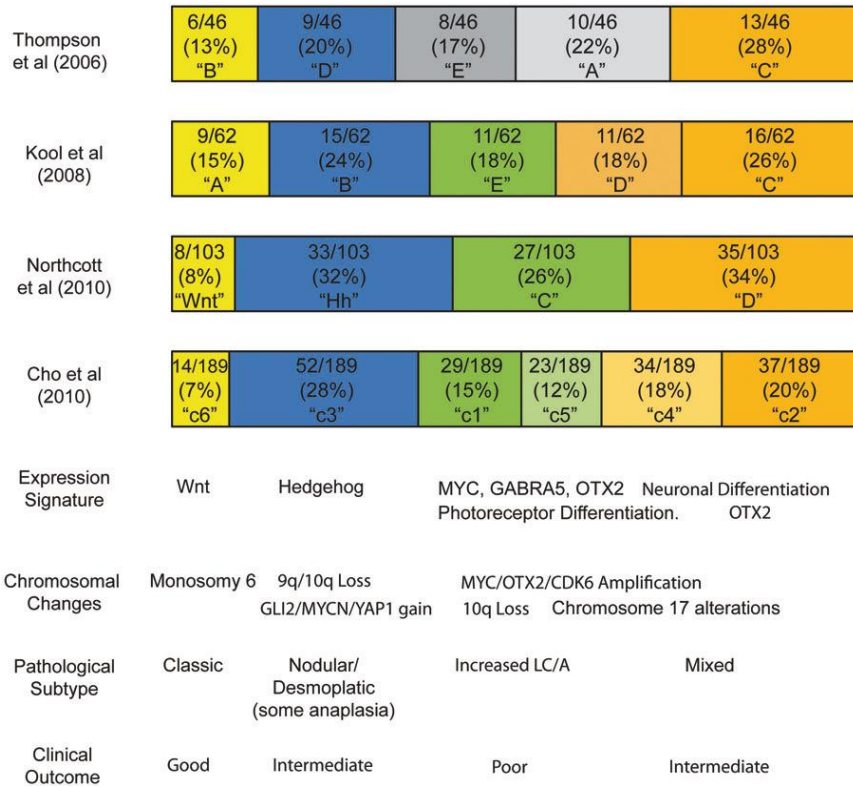


FIGURA 4. Classificazione molecolare del MB. Riprodotta da Eberhart CG. *Brain Pathology* (2011)

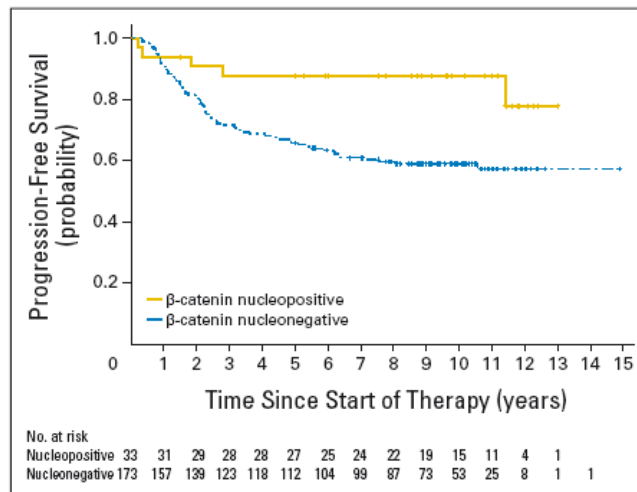


FIGURA 5. Curve di sopravvivenza libera da malattia per i pazienti di MB, suddivisi in base all'immunoreattività nucleare per β -catenina: linea gialla nucleopositivi, linea azzurra nucleonegativi; log-rank P=0.0095. Riprodotta da Ellison DW, et al. *J Clin Oncol* (2010)

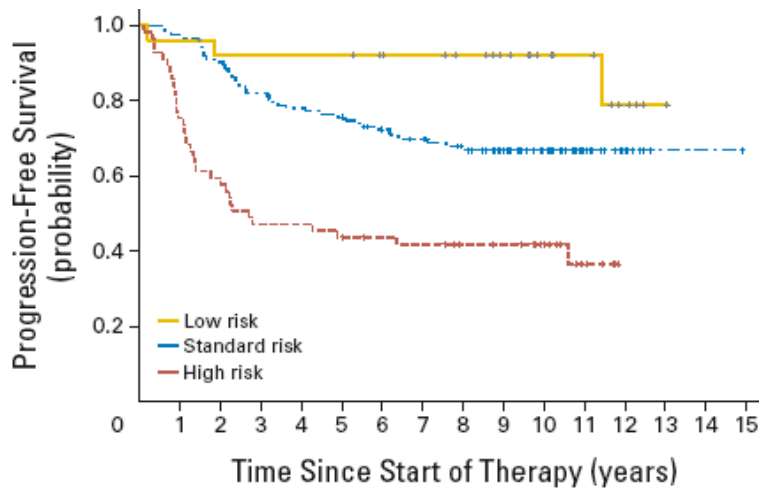


FIGURA 6. Curve di sopravvivenza libera da malattia per i pazienti di MB, suddivisi in tre categorie di rischio: *Low risk* = MB classici M0 senza amplificazione di MYC; *High risk* = MB a grandi cellule/anaplastici o MB M+ o amplificazione di MYC; *Standard risk* = i rimanenti. I numeri lungo l'asse x rappresentano i pazienti a rischio di evento; *log-rank* $P=0.0001$. Riprodotta da Ellison DW, et al. *J Clin Oncol* (2010)

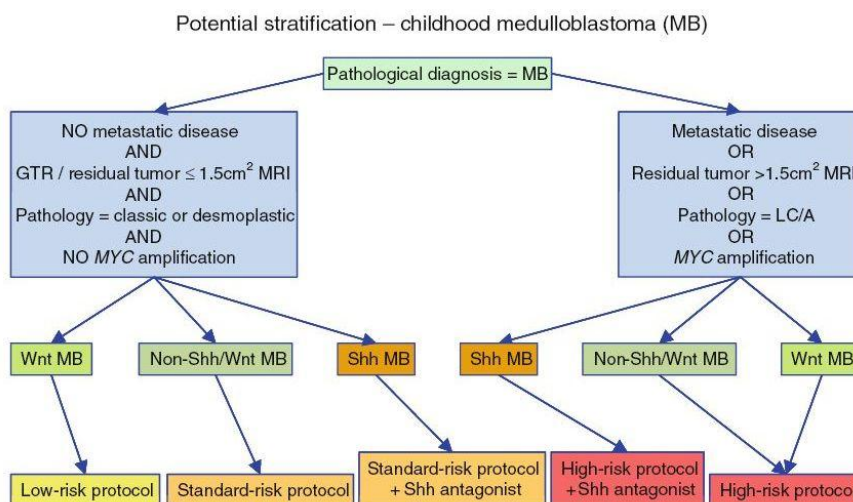


FIGURA 7. Possibile stratificazione del rischio per i pazienti di MB di età > 3 anni. Riprodotta da Ellison DW, et al. *Acta Neuropathologica* (2010)

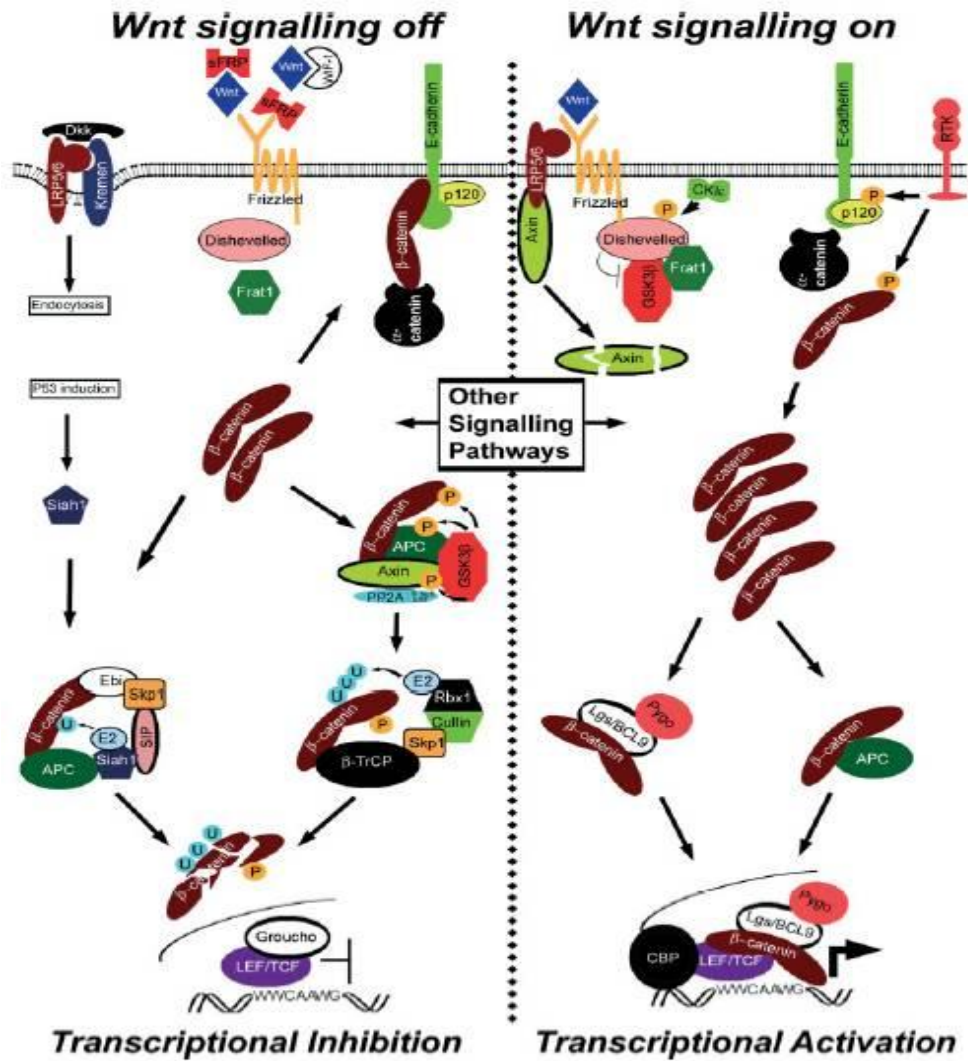


FIGURA 8. La via di segnalazione canonica WNT/ β -catenina. Wnt signalling off (a sinistra): sistema inattivo in assenza di proteine WNT, degradazione di β -catenina e inibizione trascrizionale. Wnt signaling on (a destra): sistema attivato dal legame di WNT al recettore FZD, inattivazione del complesso multiproteico con conseguente stabilizzazione di β -catenina a livello citoplasmatico e sua traslocazione al nucleo, attivazione trascrizione da parte di β -catenina/TCF-LEF.

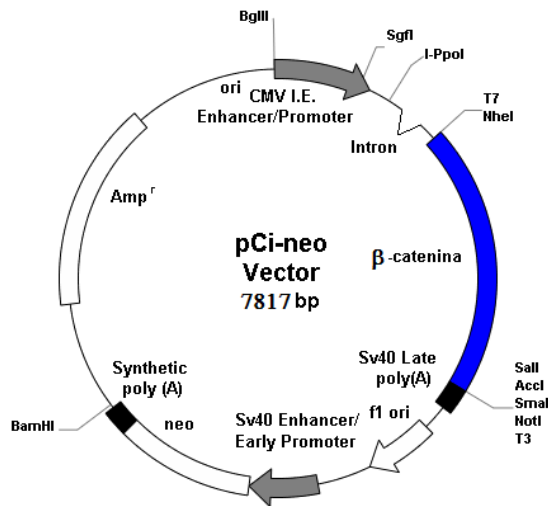


FIGURA 9. Mappa del plasmide pCi-neo/ β -cateninS33Y. A livello dei siti di restrizione XhoI/XbaI è stato inserito il transgene β -catenin S33Y, che viene espresso sotto l'azione del promotore CMV. A valle del promotore Sv40 è invece contenuto il gene neo che conferisce resistenza a neomicina e suoi analoghi, come il G418.

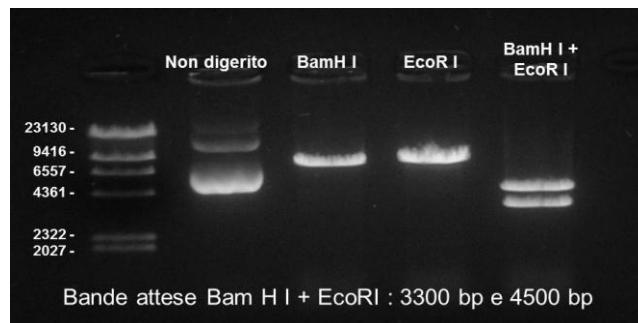


FIGURA 10. Prova di restrizione del plasmide pCi-neo/ β -cateninS33Y. Bande risultanti dall'elettroforesi su gel di agarosio: lane 1) DNA ladder (lambda DNA/HindIII fragment); lane 2) pCi-neo/ β -cateninS33Y non digerito; lane 3) pCi-neo/ β -cateninS33Y digerito con BamHI; lane 4) pCi-neo/ β -cateninS33Y digerito con EcoRI; lane 5) pCi-neo/ β -cateninS33Y digerito con BamHI ed EcoRI. Dalla doppia digestione risultano le bande attese di 4500 e 3300 bp.

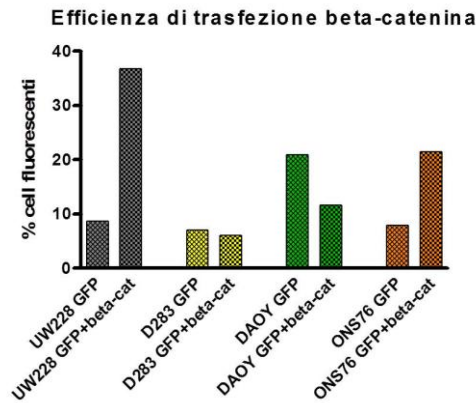


FIGURA 11. Efficienza di trasfezione del plasmide pCI-neo/ β -cateninS33Y (beta-cat nel grafico) nelle linee UW228-1, D283MED, DAOY e ONS76. Gli istogrammi rappresentano per ciascuna linea la percentuale di cellule fluorescenti (in ordinata) rilevata nella trasfezione con pIRES-EGFP o con pIRES/GFP unitamente a pCI-neo/ β -cateninS33Y (in ascissa).

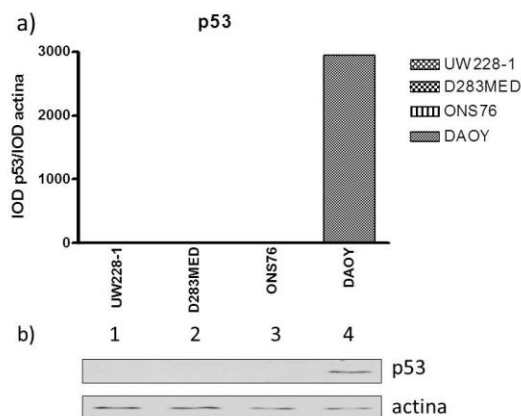


FIGURA 12. Livelli di espressione di p53 totale nelle UW228-1, D283MED, ONS76 e DAOY. a) Grafico della media dei valori ottenuti da due esperimenti indipendenti. Il grafico rappresenta la quantificazione in termini di densità ottica (IOD) (in ascissa) di p53 nelle linee considerate (ascissa). I valori di IOD di p53 sono stati normalizzati rispetto all'actina. In tutte le linee, eccetto nelle DAOY in cui p53 è altamente espressa, la proteina è presente a livelli basali. b) Immagine rappresentativa di un Western Blot: lane 1) UW228-1, lane 2) D283MED, lane 3) ONS76, lane 4) DAOY. La banda al PM atteso è presente solo nelle DAOY (lane 4).

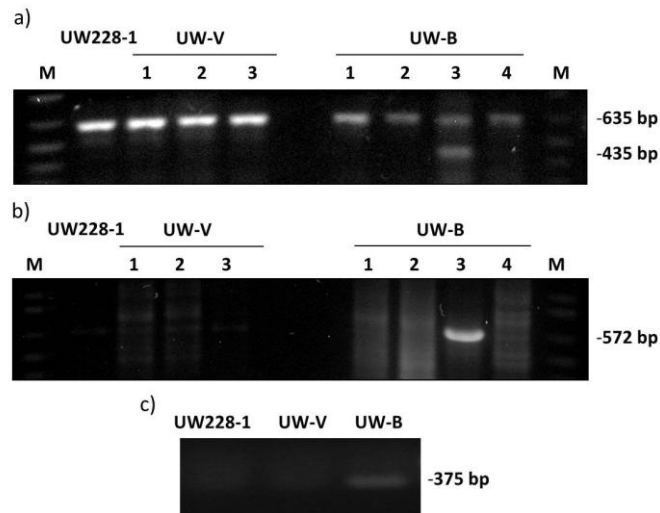


FIGURA 13. Presenza del transgene β -cateninS33Y mediante PCR nella linea originaria UW228-1, nelle 3 linee di controllo trasfettate col vettore pCl-neo (UW-V 1, 2 e 4) e nelle 4 colonie trasfettate con pCl-neo/ β -cateninS33Y (UW-B 1, 2, 3 e 4).

a) Coppia di primer BCAT3 Forward/BCAT4 Reverse: gli estratti genomici delle UW228 non modificate e delle tre colonie con pCl-neo forniscono un'amplificato di 635 bp (forma genomica di β -catenina); tra le colonie con cDNA di β -catenina solo in UW-B3 è evidente una banda aggiuntiva di 435 bp (forma plasmidica senza introni).

b) Coppia di primer CMV Forward/BCAT3 Reverse: l'unica colonia in cui si produce l'amplificato atteso di 572 bp, indicativo della presenza del transgene nel plasmide, è la colonia UW-B3.

c) Coppia di primer BCATS33Y Forward/BCAT4 Reverse: l'unica colonia in cui si produce l'amplificato atteso di 375 bp, indicativo della presenza di β -catenina mutata, è la colonia UW-B3.

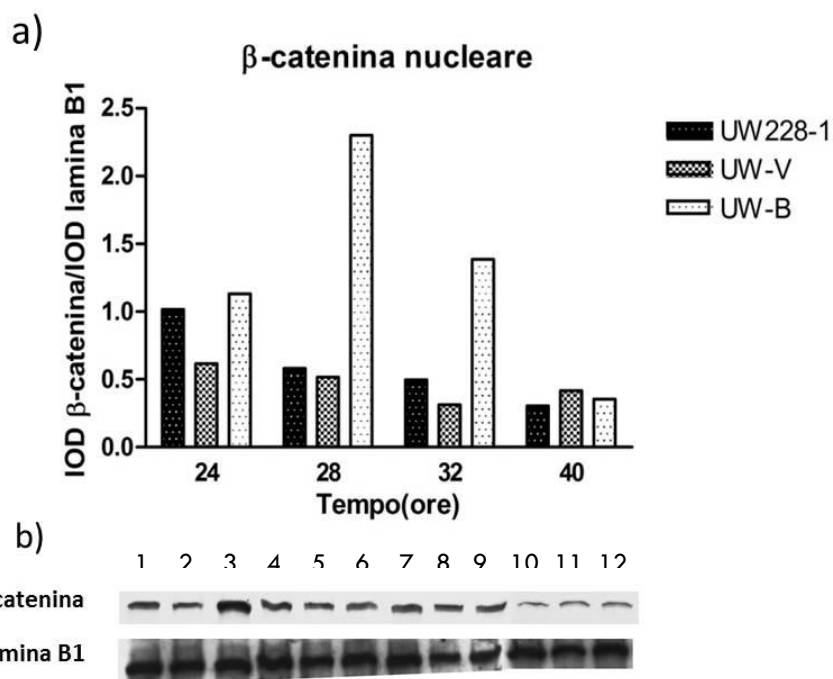


FIGURA 14. Livelli di espressione di β -catenina nucleare nella linea parentale UW228-1, in UW-V 1 e in UW-B 3: gli estratti proteici sono stati raccolti 24, 28, 32 e 40 ore dopo la piastratura.

a) Grafico della media dei valori ottenuti da due esperimenti indipendenti. Il grafico rappresenta la quantificazione in termini di densità ottica (IOD) (in ascissa) dell'espressione di β -catenina nelle linee considerate (ascissa). I valori di IOD di β -catenina sono stati normalizzati rispetto all'IOD della lamina B1. β -catenina nucleare nella linea cellulare UW-B aumentava rispetto a UW-V e UW228-1, raggiungendo un picco a 28 ore dalla messa in coltura.

b) Immagine rappresentativa di un Western Blot: lane 1) UW228-1 24h; lane 2) UW-V 24h; lane 3) UW-B 24h; lane 4) UW228-1 28h; lane 5) UW-V 28h; lane 6) UW-B 28h; lane 7) UW228-1 32h; lane 8) UW-V 32h; lane 9) UW-B 48h; lane 10) UW228-1 40h; lane 11) UW-V 40h; lane 12) UW-B 40h

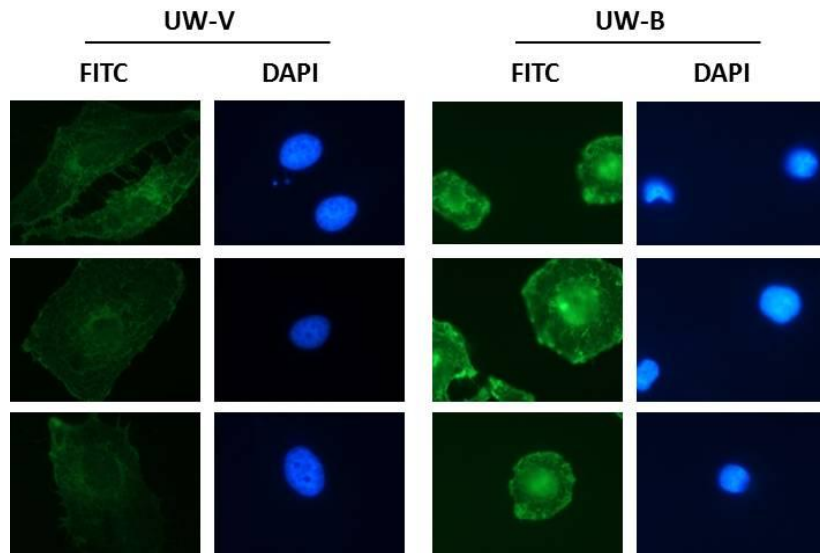


FIGURA 15. Presenza e localizzazione di β -catenina nelle colonie trasfettate. L'anticorpo secondario "Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins" è marcato con FITC (verde) mentre i nuclei sono colorati con DAPI (blu). Si osserva nella colonia UW-B 3 la forte nucleopositività per β -catenina assente nel controllo UW-V 1. Ingrandimento 100X

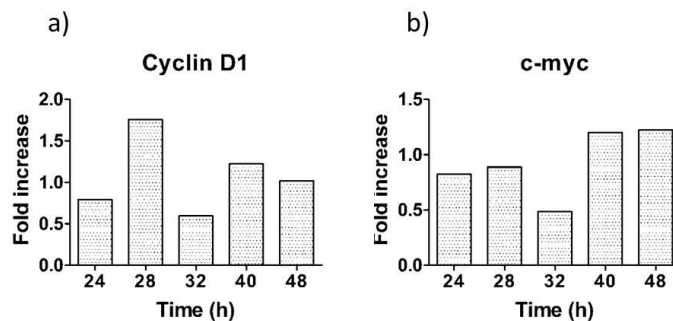


FIGURA 16. Livelli di espressione di a) ciclina-D1 e b) c-myc nella linea contenente β -catenina mutata rispetto alla linea di controllo col vettore vuoto. Gli estratti proteici totali sono stati raccolti a 24, 28, 32, 40 e 48 ore dalla messa in coltura. Le barre dei grafici rappresentano l'espressione media in tre esperimenti indipendenti di Ciclina D1 (cyclin D1) e MYC (c-myc) della linea UW-B 3/UW-V 1. I valori forniti dall'analisi dell'intensità di ciclina D1 e di MYC sono stati normalizzati rispetto ai valori dell'actina, al fine di correggere eventuali differenze nel caricamento dei campioni.

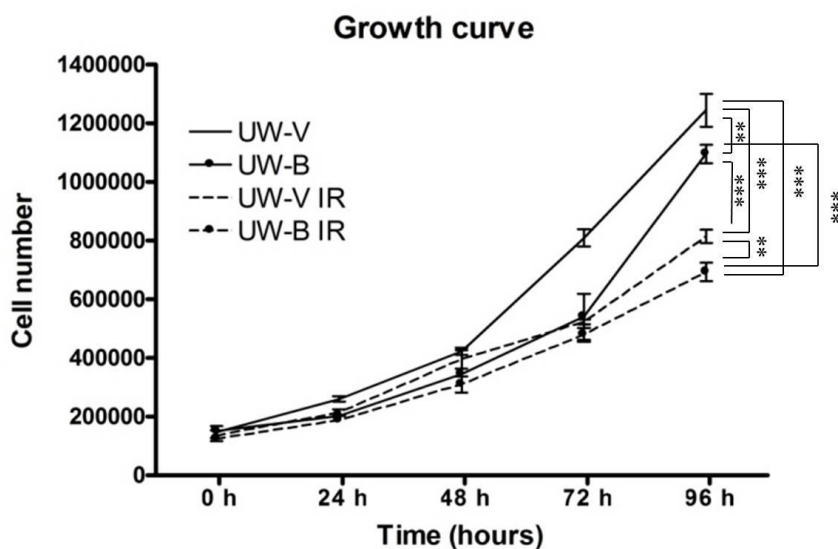


FIGURA 17. Curve di crescita colonie UW-B 3 e UW-V 1. Le curve descrivono l'andamento della vitalità cellulare (numero di cellule vive in ordinata) a 0h, 24h, 48h, 72h e 96h (in ascissa) dalle radiazioni (IR). Il grafico rappresentato su scala logaritmica i risultati di tre esperimenti indipendenti.

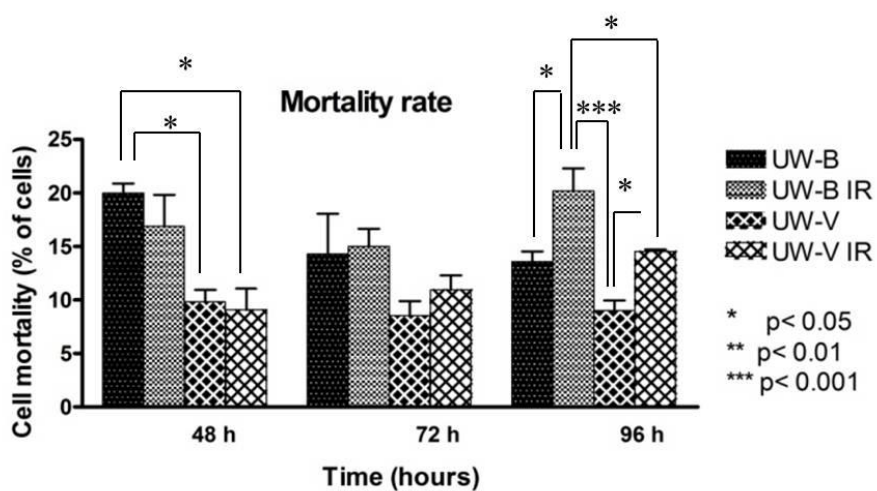


FIGURA 18. Mortalità nelle colonie UW-B 3 e UW-V 1. Gli istogrammi rappresentano la percentuale di cellule morte (in ordinata) a 48h, 72h e 96h (in ascissa) dalle radiazioni (IR).

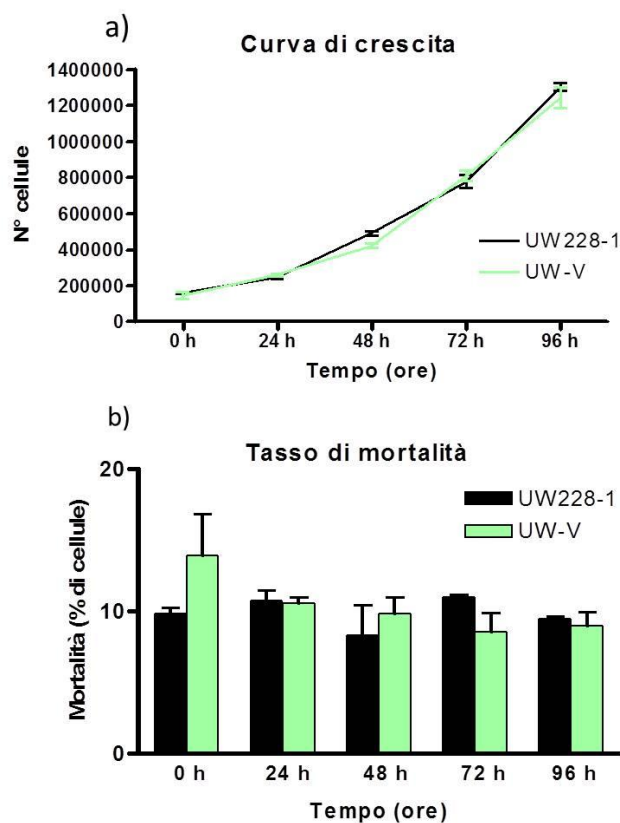


FIGURA 19. Comparabilità tra le UW228-1 originarie (verde) e la colonia UW-V 1 (nero) in termini di:

a) Crescita cellulare: le curve descrivono l'andamento della vitalità cellulare (numero di cellule vive, in ordinata) a 0h, 24h, 48h, 72h e 96h (in ascissa) dalle radiazioni. UW228-1 originarie (linea nera), UW-V 1 (linea verde chiaro). Il grafico è rappresentato su scala logaritmica

b) Mortalità cellulare: gli istogrammi rappresentano la percentuale di cellule morte/cellule totali (in ordinata) a 0h, 24h, 48h, 72h e 96h (in ascissa) dalle radiazioni.

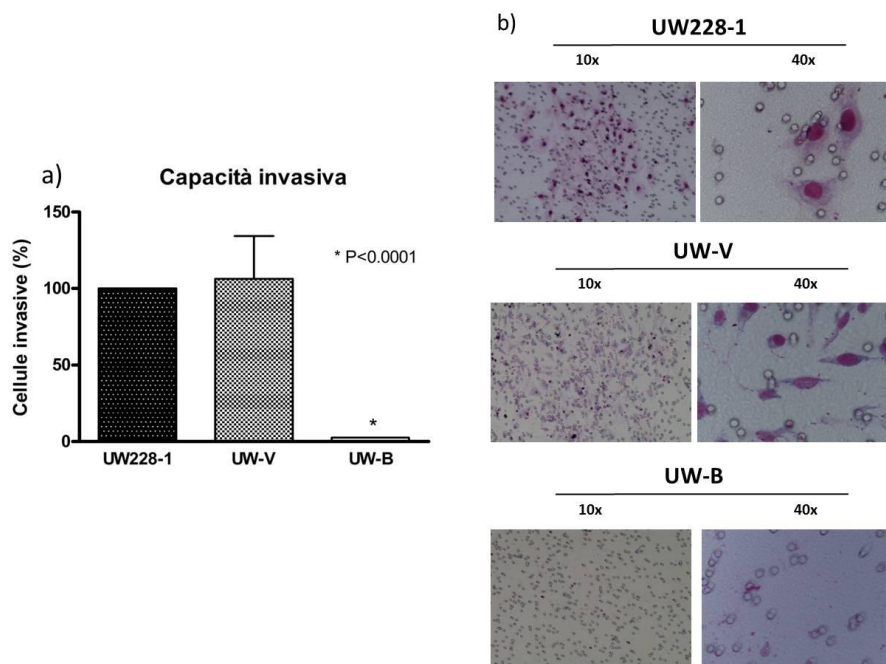


FIGURA 20. Capacità invasiva delle linee UW228-1, UW-V 1 e UW-B 3 dopo 24 ore dall'allestimento.

a) Grafico della media dei valori ottenuti da due esperimenti indipendenti. Il grafico rappresenta per i vari campioni (ascissa) il numero di cellule che hanno invaso attraverso la membrana di Matrigel® sotto debole chemioattrazione (cellule risospese in terreno senza siero attratte da terreno contenente siero al 10%) al netto dei falsi positivi (controllo negativo: cellule risospese in terreno senza siero attratte da terreno senza siero). Il numero di cellule invasive di UW-V 1 e UW-B 3 è stato normalizzato in percentuale rispetto al numero di cellule invasive della linea originaria UW228-1 (ordinata). Tra le linee di controllo UW228-1 e UW-V non sussistono sostanziali differenze, mentre nella linea UW-B cala drasticamente la capacità invasiva.

b) Immagine rappresentative dei filtri contenenti la cellule in grado di attraversare la membrana di Matrigel®.

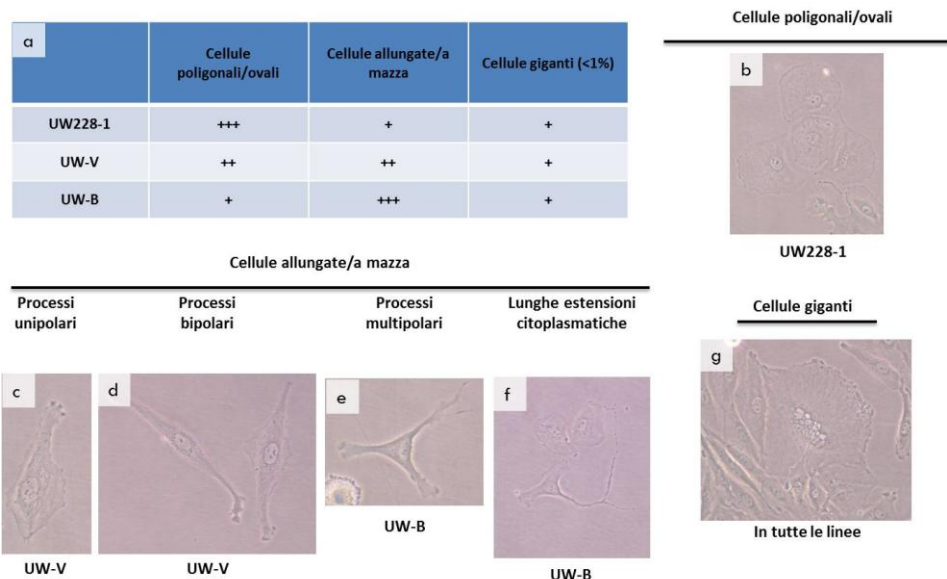


FIGURA 21. Microscopia ottica delle linee UW228-1, UW-V 1 e UW-B 3:

a) Tabella riassuntiva della distribuzione della morfologia cellulare nelle tre linee.

Definizione dei citotipi: b) cellule poligonali ovali preponderanti nelle UW228-1; c) cellule con processo unipolare (colonia UW-V); d) cellule con processi bipolari (colonia UW-V); e) cellule con processi multipolari (UW-B); f) cellule con lunghi processi citoplasmatici (UW-B); g) cellule giganti (UW-V), ritrovate in tutti i campioni. Ingrandimento 20X.

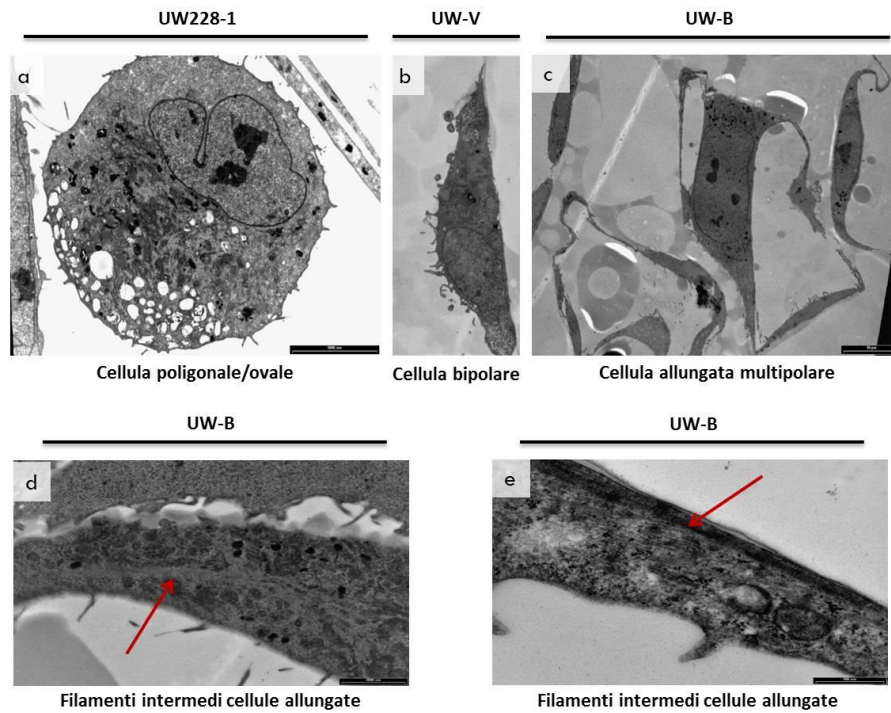


FIGURA 22. Analisi ultrastrutturale mediante microscopia elettronica a trasmissione delle linee UW228-1, UW-V 1 e UW-B 3: a) cellula rotondeggiante, con ampio citoplasma, nucleo a profilo irregolare e nucleolo prominente (UW228-1 24 ore dopo la piastratura), bar=5000 nm; b) cellula con morfologia unipolare, (UW-V a 96 ore dalla piastratura), bar=5 μ m; c) cellule con morfologia multipolare (UW-B a 96 h dalla piastratura), bar=10 μ m; d) si evidenziano microtubuli in cellula con morfologia bipolare (freccia) (UW-B a 96 h dalla piastratura), bar=500 nm; e) si evidenziano microtubuli in cellula con morfologia bipolare (freccia) (UW-B a 96 h dalla piastratura), bar=2000 nm.

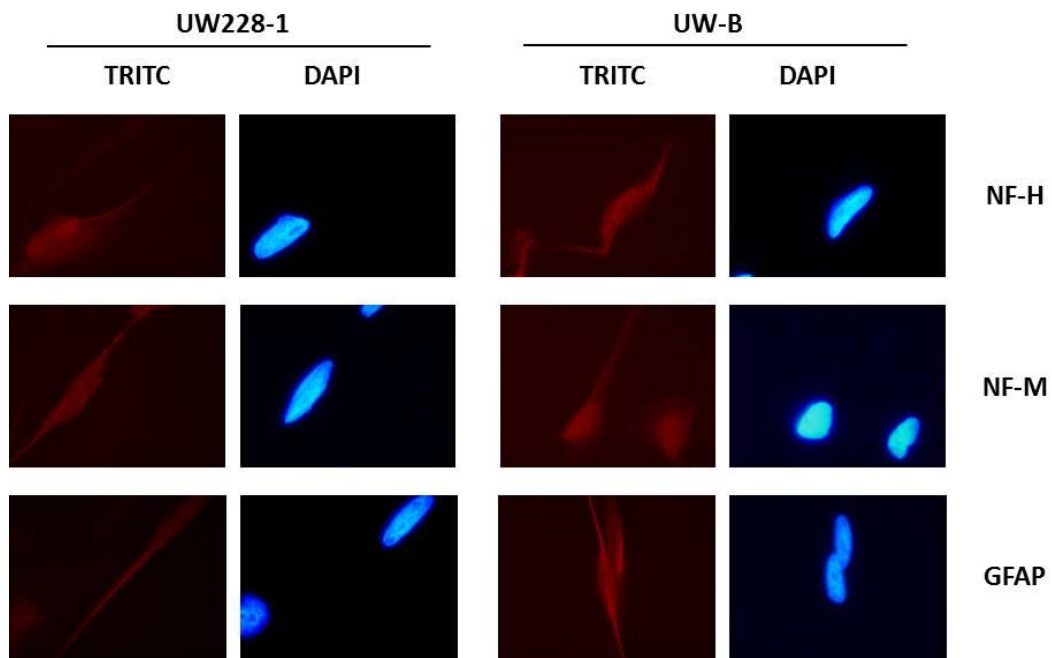


FIGURA 23. Presenza e localizzazione dei neurofilamenti ad alto ed intermedio peso molecolare (NF-H e NF-M, rispettivamente) e di GFAP in UW228-1 e UW-B 3. L'anticorpo secondario "Polyclonal Swine Anti-Mouse Immunoglobulins" è marcato con TRITC (rosso) mentre i nuclei sono colorati con DAPI (blu). Si osserva le cellule presentano una positività puntiforme per NF-H e NF-M, prevalentemente nei prolungamenti citoplasmatici, sia nelle cellule allungate della linea di controllo UW228-1, che in UW-B. Entrambe le linee mostrano positività per GFAP a livello perinucleare e dei prolungamenti. Ingrandimento 100X